

明 細 書

NK細胞に発現するタンパク質

技術分野

- [0001] 本発明は、NK細胞に発現する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNA、ならびに該分子の製造方法および用途に関する。

背景技術

- [0002] 細胞障害性T細胞は、異物である特異的抗原ペプチドと複合体を形成したMHC(Major Histocompatibility Complex、主要組織適合遺伝子複合体)クラスI分子を認識し活性化され、標的細胞に対して障害活性を発揮するのに対し、ナチュラルキラー(NK)細胞は逆にMHCクラスI分子を発現していない標的細胞をよく障害する。正常細胞表面上ではウイルス感染や癌化により、このようなMHCクラスI分子の発現が抑制される。NK細胞はこうしたMHCクラスI分子の発現が減少した異常細胞に対して障害活性を発揮し、自然免疫としてウイルス感染並びに癌化した細胞の排除機構において中心的役割を担っていると考えられている。実際、NK細胞はある種の癌細胞を自発的に障害する活性を有する細胞として見出された(非特許文献1参照)。またChediak-Higashi症候群と呼ばれる(染色体異常のため、10歳を過ぎる頃には増悪期に入りウイルス感染が制御不能となり、悪性リンパ腫様病変をきたすとされ、2〜3ヵ月の経過で汎血球減少症のため死亡する)疾患は、NK細胞活性の欠損が原因であることから、NK細胞の生体内におけるこうした役割が支持される。
- [0003] 最近、NK細胞のマーカーとされるNK1.1+CD3-を欠損したトランスジェニックマウスが作成され、その特徴を解析した結果、NK細胞が、
- 1) 癌細胞の転移と増殖の抑制において重要な役割を果たす、
 - 2) 細菌エンドトキシンに応答するInterferon(IFN) γ の主要産生細胞である、ことが示された(非特許文献2参照)。
- [0004] 一方、近年になり、同一のT細胞受容体を有し、NK細胞受容体も同時に保持する自然免疫と獲得免疫との性質を併せ持つ第4のリンパ球であるNKT細胞が肝臓、骨髄を中心とした極めて広範な臓器に分布し、かつこの細胞が免疫寛容、自己免疫疾

患、肝炎、感染症といった多くの疾病に関与しているという知見が明らかにされている。多発性硬化症を早期に発病するマウスの研究から、リンパ球に含まれる免疫細胞のNKT細胞が、多発性硬化症の発病に何らかの関連を有することが分かった(非特許文献3参照)。また、主要な喘息症状であるアレルギー性気道過反応がNKT欠損マウスでは示されなかったことから、NKT細胞を不活化して喘息を予防できる可能性が示唆される(非特許文献4参照)。このNKT細胞は、NK細胞と異なりT細胞レセプターに対する刺激、或いは樹上細胞上CD1dレセプターに提示される糖脂質であるアルファガラクトシルセラミド(α -GalCer)により活性化されるという活性化機構が明らかとなっている(非特許文献3参照)。一方で、NK細胞と同様に、MHCクラスI分子の発現が減少した細胞に対する障害活性を発揮することから、リンパ球集団の細胞障害活性における阻害的調節分子として同定されているKiller Cell Inhibitory Receptor (以下KIR)と、ほぼ同様の機構で細胞障害活性を調節していると思われる。ところが既知のKIRを発現していないNKTサブセット群も知られており、活性化に対して負に働く阻害型受容体およびシグナルカスケードについては不明な点が多く、更なる研究が必要となっていた。

[0005] NKT細胞の活性化に効果的なリガンド物質は明らかとなっているが、NK細胞を特異的に活性化する低分子リガンドは同定されていない。

[0006] 非特許文献1: Trinchieri G., Adv Immunol. (1989), 47, 187-376

非特許文献2: Sungjin Kim, Koho Iizuka, Hector L. Aguila, Irving L. Weissman, and Wayne M. Yokoyama, Proc. Natl. Acad. Sci. (2000), 97, 2731-2736

非特許文献3: 原田通成・谷口克, 蛋白質 核酸 酵素 (2002), 47, 2109-2116

非特許文献4: Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT, Nat. Med. (2003), 9, 582-588

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、NK細胞を特異的に活性化または不活化する受容体分子を単離することにある。より詳しくは、NK細胞に発現する新規な受容体タンパク質、および該タンパク質をコードするDNA、およ

び該分子の用途の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] NK細胞の活性化機構は、タンパク質チロシンキナーゼによるリン酸化を介した正のシグナルカスケードとリン酸化を受けたシグナル伝達分子の脱リン酸による負のシグナルカスケードの調節により行われていることが示唆されている。この負のカスケードを駆動するための分子を認識するNK細胞の阻害型受容体が、マウスでは細胞外にCタイプレクチンドメインを有するCタイプレクチンファミリーであるLy49分子群であり、ヒトでは細胞外に免疫グロブリン (Immuoglobulin, Ig) ドメインを有するKIR分子ファミリーが相当する。KIR分子については、それが認識するMHCアロタイプを含めた詳細が明らかとなってきた。NK細胞はMHCクラスI分子の発現が減少した細胞に対する障害活性を発揮することから明らかなように、KIR分子の多くが、多型を有し殆どの細胞で発現する古典的MHCクラスI分子を認識し負のシグナルを細胞内に伝達する。一方でKIR分子の中には非古典的MHCクラスI分子をリガンドとする分子種も有り、KIR分子全体が自然免疫系において自己由来の異常細胞に対する監視機構の中心的役割を果たすとされている。

[0009] KIR分子中にはLy49同様、細胞質内ドメインにITIMと呼ばれるV/I XYXX L/V (V; バリン、I; イソロイシン、Y; チロシン、L; ロイシン、Xは任意のアミノ酸) モチーフを有する機能性配列が存在しており、本ITIMモチーフ中のチロシン残基がリン酸化されると、本部位にSH2ドメインを有するタンパク質チロシン脱リン酸化酵素であるSHP-1が結合する。NK細胞での正のシグナルカスケードの活性化に必須なチロシンリン酸化タンパク質 (SLP-76分子がその候補として有力視されている。) をSHP-1が脱リン酸することにより、NK細胞の活性化を抑制している。

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った。本発明者らは、<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp>で公開されている、純化した免疫系細胞 (単球・マクロファージ、T細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球など) のSerial Analysis of Gene Expression (SAGE) 解析データ (Hashimoto S, Blood (2003), 101, 3509-3513) を参照した。解析データの中には、既知遺伝子配列の配列タグとして同定されたものの他に、未知遺伝子由来と考えられるものが多数同定され、かつ、その

なかに特徴的な発現プロファイルをもつものが同定された。

[0011] これらの中から、本発明者らは、ナチュラルキラー (NK) 細胞に特異的に発現する NKIR 遺伝子を見出すことに成功した。その予想アミノ酸配列の特徴から、本遺伝子は NK 細胞及び一部の T 細胞に発現し、リンパ球集団の細胞障害活性における阻害的調節分子として同定されている Killer Cell Inhibitory Receptor (以下 KIR) のホモログであることが示唆された。本 NKIR 遺伝子は、多くの KIR 分子群が 19 番染色体上にクラスターをなしているのに対して、第一番染色体にマップされる。また本発明者らは、創薬への応用の可能性を追求するために本遺伝子の特徴解析を行った。本発明の遺伝子のスプライシングバリエーションと考えられる配列は報告 (WO01/49728 号) されており、NCBI Annotation Project においてはゲノム配列からの予測により、そのスプライシングバリエーションがアサインされている (LOC343413) もの、その機能については全く知られていない。また、本発明の遺伝子と完全に一致する配列は、これまでのところ知られていない。

[0012] 前述のように NK 細胞は抗腫瘍、抗ウイルス活性を有することから、臨床応用の可能性としては、KIR に対するアンタゴニスト抗体を用いた KIR の機能抑制による抗腫瘍効果、抗ウイルス効果が考えられる。また、NKT 細胞を標的とした場合、アンタゴニスト抗体を用いた抗 C 型肝炎等の抗ウイルス性疾患や抗癌、あるいはアゴニスト抗体を用いた抗アレルギー性疾患、抗喘息、抗自己免疫疾患への用途に対する可能性が期待される。

[0013] 本発明は、NK 細胞に発現する新規なタンパク質、該タンパク質をコードする DNA、およびこれらの製造方法および用途に関し、より具体的には、

- [1] 下記 (a) - (d) のいずれかに記載の DNA、
 - (a) 配列番号: 2、4、または 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA
 - (b) 配列番号: 1、3、または 5 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA
 - (c) 配列番号 2、4 または 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパ

ク質であって、配列番号2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA

〔2〕 配列番号:2、4、または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の断片をコードするDNA、

〔3〕 〔1〕または〔2〕に記載のDNAによりコードされるタンパク質、

〔4〕 〔1〕または〔2〕に記載のDNAを含むベクター、

〔5〕 〔1〕もしくは〔2〕に記載のDNA、または〔4〕に記載のベクターを保持する宿主細胞、

〔6〕 〔5〕に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたタンパク質を回収する工程を含む、〔3〕に記載のタンパク質の製造方法、

〔7〕 〔3〕に記載のタンパク質に結合する抗体、

〔8〕 以下の(a)および(b)の工程を含む、〔3〕に記載のタンパク質に対するリガンドの同定方法、

(a) 〔3〕に記載のタンパク質または〔3〕に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程

(b) 候補化合物が〔3〕に記載のタンパク質または〔3〕に記載のタンパク質を発現している細胞に結合するか否かを検出する工程

〔9〕 以下の(a)および(b)の工程を含む、〔3〕に記載のタンパク質に対するアゴニストの同定方法、

(a) 〔3〕に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程

(b) 候補化合物が〔3〕に記載のタンパク質の活性化の指標となるシグナルを発生させるか否かを検出する工程

〔10〕 以下の(a)および(b)の工程を含む、〔3〕に記載のタンパク質に対するアンタゴニストの同定方法、

(a) 〔3〕に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程

(b) 候補化合物の非存在下で検出した場合と比較して、〔3〕に記載のタンパク質の

活性化の指標となるシグナルが減少するか否かを検出する工程

[11] [8]に記載の方法によって同定され得る、[3]に記載のタンパク質に対するリガンド、

[12] [9]に記載の方法により同定され得る、[3]に記載のタンパク質に対するアゴニスト、

[13] [10]に記載の方法により同定され得る、[3]に記載のタンパク質に対するアンタゴニスト、

[14] 以下の(a)または(b)を少なくとも1つ含む、[8]から[10]のいずれかに記載の方法に用いるためのキット、

(a) [3]に記載のタンパク質

(b) [5]に記載の宿主細胞

[15] [3]に記載のタンパク質に対するアゴニスト(または[12]に記載のアゴニスト)を有効成分として含有する、免疫抑制剤、

[16] [3]に記載のタンパク質に対するアゴニスト(または[12]に記載のアゴニスト)を有効成分として含有する、アレルギー性疾患または自己免疫疾患治療剤、

[17] [3]に記載のタンパク質に対するアンタゴニスト(または[13]に記載のアゴニスト)を有効成分として含有する、免疫増強剤、

[18] [3]に記載のタンパク質に対するアンタゴニスト(または[13]に記載のアゴニスト)を有効成分として含有する、抗腫瘍または抗ウイルス剤、

[19] [1]または[2]に記載のDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、

[20] [19]に記載のDNA、または[7]に記載の抗体を含む、[3]に記載のタンパク質をコードする遺伝子の発現の異常または活性の異常に関連した疾患の検査薬、を提供するものである。

[0014] また本発明の別の態様においては、

(a) 本発明のタンパク質の、該タンパク質のアゴニストもしくはアンタゴニストのスクリーニングのための使用

(b) 本発明のタンパク質に対するアゴニストの、免疫抑制剤の製造のための使用

(c) 本発明のタンパク質に対するアゴニストの、アレルギー性疾患もしくは自己免疫疾患治療剤の製造のための使用

(d) 本発明のタンパク質に対するアンタゴニストの、免疫増強剤の製造のための使用

(e) 本発明のタンパク質に対するアンタゴニストの、抗腫瘍剤もしくは抗ウイルス剤の製造のための使用

を、提供するものである。

[0015] さらに本発明は、以下の方法に関する。

(a) 対象者(患者等)へ本発明のタンパク質に対するアゴニストを投与する工程を含む、免疫機能を抑制させる方法。

(b) 対象者(患者等)へ本発明のタンパク質に対するアゴニストを投与する工程を含む、アレルギー性疾患もしくは自己免疫疾患の治療方法(あるいは予防方法)。

(c) 対象者(患者等)へ本発明のタンパク質に対するアンタゴニストを投与する工程を含む、免疫機能を増強させる方法。

(d) 対象者(患者等)へ本発明のタンパク質に対するアンタゴニストを投与する工程を含む、癌(腫瘍)もしくはウイルス性疾患の治療方法(あるいは予防方法)。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、Hisトラップカラムを用いて精製したNKIR融合タンパク質のSDS-PAGE電気泳動による分析結果を示す写真である。

[図2]図2は、抗NKIRポリクローナル抗体によるNKIRタンパク質の検出を示す写真である。

[図3]図3は、RT-PCRによる組織発現解析の結果を示す写真である。AはMTCパネルIおよびIIについて、BはImmune SystemおよびBlood Fractionについて示す。以下に各レーンについて示す。A:レーン1:心臓、レーン2:脳、レーン3:胎盤、レーン4:肺、レーン5:肝臓、レーン6:骨格筋、レーン7:腎臓、レーン8:脾臓、レーン9:脾臓、レーン10:胸腺、レーン11:前立腺、レーン12:精巣、レーン13:卵巣、レーン14:小腸、レーン15:大腸、レーン16:末梢血白血球B:レーン1:脾臓、レーン2:リンパ節、レーン3:胸腺、レーン4:末梢血白血球、レーン5:扁桃、レーン6:胎児肝臓、レーン7:骨髄、レーン8:単核細胞、レーン9:休止CD8+細胞、レーン10:休止CD4+細胞、

レーン11:休止CD14+細胞、レーン12:休止CD19+細胞、レーン13:活性化CD19+細胞、レーン14:活性化単核細胞、レーン15:活性化CD4+細胞、レーン16:活性化CD8+細胞

[図4]図4は、NK-92細胞株が発現する天然NKIRタンパク質の抗NKIRポリクローナル抗体による検出を示す写真である。

[図5]図5は、NK-92細胞株の抗NKIRポリクローナル抗体によるフローサイトメトリー解析を示す図である。

[図6]図6は、COS-7株でのNKIR遺伝子の一過性発現に対するフローサイトメトリー解析を示す図である。

[図7]図7は、ヒトNKIRをqueryにblast検索を行い、得られたマッチするマウス染色体配列とのアライメントを示す図である。

[図8]図8は、ヒトマウスNKIR配列のアライメントを示す図である。

[図9]図9は、各形質転換導入株のフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図10]図10は、ルシフェラーゼ活性を指標としたITIM活性のアッセイ結果を示すグラフである。

[図11-1]図11-1は、実施例16において選択された3クローンのCD8キメラ構造を示す図である。

[図11-2]図11-2は、実施例17で使用する抗CD8抗体、LT8 (Serotec) とヤギ抗マウスIgG-FITCコンジュゲート抗体 (Coulter) を用いたこれらクローンのFACS解析の結果を示す図である。A: F11クローン、LT8 (1次抗体) なし、B: F11クローン、LT8 (1次抗体) あり、C: CD8キメラクローン、LT8 (1次抗体) なし、D: CD8キメラクローン (1次抗体) あり

[図12]図12は、実施例17のレポーターアッセイによるITIM機能活性測定の結果を示す図である。LT8: 抗CD8抗体 (LT8)、CL: クロスリンカー (ラット抗マウスIgG1抗体)
発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明者らは、ヒト脾臓cDNAライブラリーよりPCRを用いてNK細胞に特異的に発現する遺伝子をクローニングした。得られたクローンには、スプライスバリエーションと

るクローンが複数含まれたため、本来の配列を得るため5' RACEを行い、KIRメンバーであることが推察されるNKIR遺伝子を同定した。該遺伝子の塩基配列を配列番号:1に、該遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:2に示す。さらに、NK-92株より調製した全RNAを用いて、5'並びに3'RACE法により再度NKIR遺伝子の全長クローニングを行ったところ、5'端に36塩基のシグナル様配列を有し、3'端側におよそ500塩基伸長した配列を有するクローンが得られた。該クローンの塩基配列を配列番号:3に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:4に示す。さらにマウスNKIR配列のクローニングを行い、得られた塩基配列を配列番号:5に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:6に示す。

[0018] 本発明は、NK細胞に発現する新規なタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAの好ましい態様としては、下記の(a)ー(d)のいずれかに記載のDNAである。

[0019] (a) 配列番号:2、4、または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(b) 配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA

(c) 配列番号:2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質であって、配列番号:2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA(より好ましくは、配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、配列番号:2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA)

[0020] 本発明は、本発明者らにより同定されたNK細胞発現タンパク質(配列番号:2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)(以下、「NKIRタンパク質」と記載す

る場合あり)と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、これらタンパク質の変異体、ヒトおよびマウス以外の生物のホモログ等が含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質がNKIRタンパク質と同様の生物学的あるいは生化学的活性を有することを指す。このような活性としては、例えば、KIRが有する活性、NK細胞による細胞障害活性に対する抑制活性、或いは細胞の活性化において同様の細胞内シグナル伝達が介在するT細胞或いはマスト細胞などの免疫系細胞を宿主として形質導入したKIR分子によるそれぞれの細胞種の活性化シグナル伝達に対する抑制活性、等を挙げることができる。従って、対象となるタンパク質が本発明者らによって同定されたタンパク質と同等の生物学的あるいは生化学的な活性を有しているか否かは、例えば、形質導入などにより当該分子種を導入した免疫系細胞の活性化シグナルに対する阻害活性を、細胞質内カルシウム濃度の測定により検出する方法(Bruhns P, Marchetti P, Fridman WH, Vivier E, Daeron M., J Immunol. (1999), 162, 3168-3175)、またはカルシニューリンカスケード制御下にあるNF-ATシス配列を有したレポーター遺伝子の発現を測定することにより検出する方法(Fry AM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300)、或いは宿主としてマスト細胞を用いた場合には同様にCaカスケードの下流にあるセロトニンの放出を³Hラベルしたセロトニンの測定により検出する方法(Blery M, Delon J, Trautmann A, Cambiaggi A, Olcese L, Biassoni R, Moretta L, Chavrier P, Moretta A, Daeron M, Vivier E., J Biol Chem. (1997), 272, 8989-8996.)によって評価することが可能である。

- [0021] あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、例えば、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。具体的には、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492、Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、配列番号:2、4、または6に記載のアミノ酸

配列に適宜変異を導入することにより、該タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたNKIRタンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内)であると考えられる。

[0022] また、変異導入部位は特に制限されないが、後述のモチーフもしくはドメイン以外の部位であることが好ましい。

[0023] 変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)を挙げることができる(括弧内はいずれもアミノ酸の一字表記を表す)。

[0024] あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

[0025] NKIRタンパク質のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質には、これらタンパク質を含む融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質は、これらタンパク質と他のペプチド又はタンパク質とが融合したものであり、本発明に含まれる。

融合タンパク質を作製する方法は、NKIRタンパク質(配列番号:2、4、または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードするDNAと他のペプチド又はタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、特に限定されない。

[0026] 本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis(ヒスチジン)残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素(HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA(インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP(マルトース結合タンパク質)等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを本発明のタンパク質をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

[0027] また、あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、NKIRタンパク質をコードするDNA配列(配列番号:1、3、または5)もしくはその一部を基に、同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからNKIRタンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。

[0028] 本発明には、NKIRタンパク質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAがコードし、NKIRタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒトあるいはマウスおよび他の哺乳動物のホモログ(例えば、ラット、ウサギ、ウシ、サル、等がコードするタンパク質)が挙げられる。

[0029] NKIRタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1%SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

[0030] また、ハイブリダイゼーションにかえて、遺伝子増幅技術(PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4)を用いて、本発明者らにより同定されたタンパク質をコードするDNA配列(配列番号:1、3、または5)の一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたタンパク質をコードするDNA配列と相同性の高いDNA断片を単離し、該DNAを基に本発明者らにより同定されたタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも可能である。

[0031] 本発明のタンパク質は「成熟」タンパク質の形であっても、融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。本発明のタンパク質には、リーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え生産の際の安定性を確保する付加的配列などが含まれていてもよい。

[0032] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする、NKIRタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、これらタンパク質(配列番号:2、4、または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質)とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のタンパク質には、NKIRタンパク質と機能的に同等であり、かつ該タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を有するタンパク質も含まれる

。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

- [0033] アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215: 403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば、score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。
- [0034] 本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質は、本発明のタンパク質と機能的に同等である限り、本発明に含まれる。
- [0035] 本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号:1、3、または5に記載の塩基配列を有するDNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。
- [0036] また、本発明のタンパク質をグルタチオンS-トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞(例えば、動物細胞や大腸菌など)内で発現させた場合には、発現させた組み

換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち、目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

[0037] 天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述する本発明のタンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティーカラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

[0038] 本発明は、また、本発明のタンパク質の断片(部分ペプチド)を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するタンパク質である。本発明のタンパク質の断片は、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上(例えば、15アミノ酸残基以上)の配列からなるタンパク質の断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、 α ヘリックスと α ヘリックス形成領域、 β シートと β シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 α 両親媒性領域、 β 両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、本発明のタンパク質の活性を媒介するものである。例えば、リガンドが結合して細胞内ヘシグナル伝達を行う活性を有する断片が挙げられる。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含まれる。これらのタンパク質断片は、抗原活性を含めた本発明のタンパク質の生物学的または生化学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの

、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、Ala, Val, LeuとIleの間、SerとThrの間、酸性残基AspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基LysとArgの間、または芳香族残基PheとTyrの間で起こる。

- [0039] 本発明の上記タンパク質断片は特に制限されないが、後述のモチーフもしくはドメインを少なくとも含むような断片であることが好ましい。
- [0040] 上記断片は、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合するリガンドとなる化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに利用し得る。
- [0041] 本発明のタンパク質断片(部分ペプチド)は、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。タンパク質断片(部分ペプチド)の合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。
- [0042] また、本発明における「リガンド」とは、本発明のタンパク質に結合する分子を意味する。リガンドには天然リガンドおよび合成リガンドが含まれる。「アゴニスト」とは、本発明のタンパク質に結合し、それを活性化する分子を意味する。一方「アンタゴニスト」とは、本発明のタンパク質の活性化を阻害する分子を意味する。
- [0043] 本発明のタンパク質をコードするDNAは、上述したような本発明のタンパク質のin vivoやin vitroにおける生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患や本発明のタンパク質により治療可能な疾患の遺伝子治療、あるいは遺伝子診断などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。
- [0044] 本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNA配列(例えば、配列番号:1、3、または5)の一部をプローブとしてハイブリダイゼーショ

ンを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えば、文献(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載の方法により調製してもよく、あるいは市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成後、本発明のDNA配列(例えば、配列番号:1、3、または5)に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

[0045] また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

[0046] 具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器(例えば、NK細胞や後述の実施例において発現が認められた組織)から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

[0047] 得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNAの合成および増幅を行うことができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクタ

ーを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

- [0048] また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮し、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる(Grantham, R. et al., *Nucleic Acids Research* (1981) 9, r43-74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン(ATG)及び／又は終止コドン(TAA、TGA、又はTAG)の挿入等が挙げられる。
- [0049] 本発明のDNAはまた、配列番号:1、3、または5に示す各塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。ハイブリダイゼーションにおける条件は当業者であれば適宜選択することができるが、具体的には上記した条件を用いることができる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。上記のハイブリダイズするDNAは、好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又はゲノムDNAである。
- [0050] 本発明は、また、本発明のDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。
- [0051] 本発明のベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌(例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue)などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子(例えば、なんらかの薬剤(アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的

とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Wardら, Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーター (Betterら, Science (1988) 240, 1041-1043)、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)などが挙げられる。

[0052] また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

[0053] 大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (インビトロゲン社製)や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovairus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

[0054] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すれば

さらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0055] さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター（pcDなど）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

[0056] 一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明のタンパク質コードする遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えばpAdexlcw）やレトロウイルスベクター（例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning ,5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

[0057] また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

- [0058] 真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ベールンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。
- [0059] 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。
- [0060] 原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。
- [0061] これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞をin vitroで培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6-8であるのが好ましい。培養は、通常、約30-40℃で約15-200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。
- [0062] 一方、in vivoでタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生

系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

[0063] 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、例えば、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等を用いることができる(Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

[0064] 例えば、目的とするDNAを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

[0065] また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる(Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

[0066] さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる(Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

[0067] これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外(培地など)から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。

[0068] 本発明は、本発明の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたタンパク質を回収する工程を含む、本発明のタンパク質の製造方法を提供

する。

- [0069] タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。
- [0070] クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。
- [0071] なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。
- [0072] 本発明は、また、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。
- [0073] 抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。
- [0074] 本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペ

プチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基(N)末端断片やカルボキシ(C)末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

- [0075] 本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感じ作抗原として用いられよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質を感じ作抗原として使用してもよい。短いペプチドは、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリアタンパク質と適宜結合させて抗原とすることが好ましい。
- [0076] 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。
- [0077] げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル(旧世界ザル)、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。
- [0078] 感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法に従って行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4〜21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。
- [0079] ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感じ作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては

、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

- [0080] モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。
- [0081] 前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。
- [0082] 細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の変換培養液、例えば、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の変界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。
- [0083] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる(特開昭63-17688号公報)。
- [0084] 次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカ

ラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

- [0085] 例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号WO92-03918、WO93-2227、WO94-02602、WO94-25585、WO96-33735およびWO96-34096参照）。
- [0086] ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(oncogene)により不死化させた細胞を用いてもよい。
- [0087] このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。
- [0088] さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152,

2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

- [0089] 抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。
- [0090] また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR(相補性決定領域)とヒト抗体由来のFR(フレームワーク領域)及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。
- [0091] 前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により行うことができる。
- [0092] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。
- [0093] アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and

Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

- [0094] また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。
- [0095] これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触させ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、本発明のタンパク質を用いた種々の実験等に有用である。
- [0096] 本発明はまた、本発明のDNA(例えば、配列番号: 1、3、または5に記載の塩基配列からなるDNA)またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAを提供する。
- [0097] ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載した

ものを使用すればよい。

- [0098] このような核酸には、本発明のタンパク質をコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、該DNAの発現を検出するためのプローブやプライマー、本発明のタンパク質の発現を制御するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、またはこれらをコードするDNA等)が含まれる。また、このような核酸は、DNAチップの作製に利用することもできる。
- [0099] プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的とし、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。
- [0100] 本発明はまた、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現の異常または本発明のタンパク質の活性(機能)の異常に関連した疾患の検査薬を提供する。
- [0101] その一つの態様は、上記した本発明のタンパク質をコードするDNAまたはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAを含む検査薬である。該DNAは、上記本発明の検査方法において、本発明のタンパク質をコードする遺伝子またはその発現制御領域を検出するためのプローブとして、本発明のタンパク質をコードする遺伝子またはその発現制御領域を増幅するためのプライマーとして用いることができる。本発明のDNAは、例えば市販のDNA合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得されるの二本鎖DNA断片として作製することもできる。本発明のDNAをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、DNAの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法(ランダムプライム法等)を例示することができる。
- [0102] 本発明の検査薬の他の一つの態様は、後述する本発明のタンパク質に結合する抗体を含む検査薬である。該抗体は、上記の本発明の検査方法において、本発明のタンパク質を検出するために用いられる。抗体は、本発明のタンパク質を検出可能であればその形態に制限はない。検査のための抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体は必要に応じて標識されていてもよい。

- [0103] 上記の検査薬においては、有効成分であるDNAや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。
- [0104] また、本発明の受容体タンパク質は、そのリガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストの同定に有用である。本発明は、本発明のタンパク質を用いた、該タンパク質のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストの同定（スクリーニング）方法を提供する。
- [0105] 本発明のリガンドの同定方法の好ましい態様においては、まず、本発明のタンパク質または該タンパク質を発現している細胞と候補化合物（被検試料）を接触させ、次いで候補化合物が本発明のタンパク質または該タンパク質を発現している細胞に結合するか否かを検出（結合活性を評価）する。次いで、結合活性を有する化合物をリガンドとして選択する。
- [0106] 本発明の同定（スクリーニング）方法に用いられる本発明のタンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。候補化合物としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。候補化合物を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶性タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、あるいは膜画分として候補化合物（被検試料）に接触させることができる。
- [0107] 本発明のタンパク質を用いて、例えば該タンパク質に結合するタンパク質をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターへ挿入し、動物細胞等で該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London,

p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば特に制限されない。

[0108] 動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法であってもよい。

[0109] 特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位(エピトープ)を本発明のタンパク質のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる(実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

[0110] 融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン(His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質(VSV-GP)、T7 gene10 タンパク質(T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイル

ス糖タンパク質(HSV-tag)、E-tag(モノクローナルファージ上のエピトープ)などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる(実験医学 13, 85-90 (1995))。

- [0111] 免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。
- [0112] 免疫複合体は、例えば、抗体がマウスIgG 抗体であれば、Protein A SepharoseやProtein G Sepharoseを用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。
- [0113] 免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献(Harlow,E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988))記載の方法に従って、または準じて行えばよい。
- [0114] 免疫沈降されたタンパク質の解析にはSDS-PAGEが一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である³⁵S-メチオニンや³⁵S-システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を

向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

[0115] また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法(Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90)を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器(例えば、NK細胞)よりファージベクター(λ gt11, ZAPなど)を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタンパク質と結合したタンパク質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質に融合したペプチド又はポリペプチド(例えばGSTなど)に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

[0116] また、本発明の上記同定(スクリーニング)方法の他の態様としては、細胞を用いた2-ハイブリッドシステム(Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもクロンテック社製), 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(ストラタジーン社製))を用いて行う方法が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する(酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、

陽性のクローンが確認できる)。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするタンパク質を得ることができる。これにより本発明のタンパク質に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。2ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

- [0117] 本発明のタンパク質と結合する候補化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される候補化合物を適用する。この場合の候補化合物としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。候補化合物を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。
- [0118] 得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。
- [0119] 本発明において、結合した候補化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明のタンパク質と候補化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である(例えばBIAcore、Pharmacia製)。従って、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明のタンパク質と候補化合物との結合を評価することが可能である。
- [0120] さらに、上記した本発明の方法によって同定され得るリガンドもまた、本発明に含まれる。
- [0121] 本発明のタンパク質に対するアゴニストの同定方法の好ましい態様においては、まず、本発明のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させ、候補化合物

が本発明のタンパク質の活性化の指標となるシグナルを発生するか否かを検出する。即ち、本発明の受容体タンパク質に対し候補化合物を作用させ、本発明のタンパク質がアゴニスト刺激に応答して発生するシグナルの有無を指標として、候補化合物がアゴニストであるか否かを判定する方法である。

[0122] 本発明者らは、本発明の受容体タンパク質が発生するシグナルによって、免疫抑制作用が誘起されることを見出した。従って、本発明の上記シグナルの有無の検出は、例えば、免疫抑制作用の誘起の有無等を測定することによって行うことができる。元来交叉性のないマウスとヒト間の免疫系を免疫能欠損マウス中にヒト造血幹細胞を移植することによりヒト免疫系を再構築したヒト型モデルマウス(Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K and Nakahata T, Blood (2003), 102, 873-880)を用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)を誘導した後、アゴニスト候補物質を投与しかかるマウスに対するEAE評価(後肢の麻痺、尿失禁及び体重減少の定量)を行うことによる研究例などが一例となりうる。上記方法においては、上記シグナルが検出された場合に、候補化合物はアゴニストであるものと判定される。なお上記方法によって同定され得るアゴニストもまた、本発明に含まれる。

[0123] また本発明は、本発明のタンパク質に対するアゴニストを有効成分として含有する、免疫抑制剤を提供する。本発明の免疫抑制剤は、例えば、アレルギー性疾患(例えば、アレルギー性喘息等)、自己免疫疾患等の治療に有効であるものと期待される。従って本発明は、本発明のタンパク質に対するアゴニストを有効成分として含有する、アレルギー性疾患、または自己免疫疾患治療剤を提供する。

[0124] 本発明のタンパク質に対するアンタゴニストの同定方法の好ましい態様においては、まず、本発明のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させ、次いで、候補化合物の非存在下で検出した場合と比較して、本発明のタンパク質の活性化の指標となるシグナルが減少するか否かを検出する。

[0125] 本発明の受容体タンパク質の発生するシグナルを減少(抑制)させることにより、例えば、免疫増強作用(例えば、抗ウイルス活性、抗腫瘍活性等)が引き起こされるものと考えられる。従って、本発明の上記シグナルの減少は、例えば、免疫増強作用の

上昇を検出することにより、測定することができる。in vitroにおいてはNK細胞による標的細胞(例えば、K-562株などのNK感受性株)に対する細胞障害活性をかけるアンタゴニスト候補物質の存在或いは非存在下で測定、比較することにより、またin vivoでは先に記したヒト免疫系を再構築したヒト型モデルマウスを用いてウイルス感染ヒト細胞、或いはヒト癌組織を移植した後アンタゴニスト候補物質を投与し、かかるマウスに対する移植ウイルス感染細胞或いは癌組織に対する細胞障害活性を評価することによる研究例などが一例となりうる。

[0126] 上記方法においては、上記シグナルの減少が検出された場合に、候補化合物はアンタゴニストであるものと判定される。なお上記方法によって同定され得るアンタゴニストもまた、本発明に含まれる。

[0127] また本発明は、本発明のタンパク質に対するアンタゴニストを有効成分として含有する、免疫増強剤を提供する。本発明の免疫増強剤は、例えば、抗腫瘍剤、または抗ウイルス剤として有効であるものと期待される。従って本発明は、本発明のタンパク質に対するアンタゴニストを有効成分として含有する、抗腫瘍剤、抗ウイルス剤を提供する。

[0128] また、アゴニストまたはアンタゴニストなどの本発明のタンパク質に結合する化合物を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法(Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64、Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13、Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9)が当業者に公知である。

[0129] 本発明は、また、上記同定(スクリーニング)方法に用いるためのキットを提供する。該キットは、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を発現する細胞を含む。

該キットには、NKIRタンパク質のリガンド、アゴニスト、あるいはアンタゴニストの候補となる化合物が含まれていてもよい。

[0130] 本発明のタンパク質、または本発明の同定(スクリーニング)方法により単離する化合物、本発明の上記薬剤をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、タンパク質や単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

[0131] 錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

[0132] 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80(TM)、HCO-50と併用してもよい。

- [0133] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。
- [0134] 患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行う。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。
- [0135] 本発明のタンパク質の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから20mgであると考えられる。
- [0136] 本発明のタンパク質と結合する化合物や本発明のタンパク質の活性を調節する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。
- [0137] 非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。
- [0138] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0139] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0140] [実施例1] 全長配列のクローニング

本発明者らは、<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp>で公開されている免疫系細胞のSAGE(SAGE:serial analysis of gene-expression)解析データ中に、NK細胞に特異的な未知遺伝子配列タグ(表1)を見出し、該当するタグが公開公報(WO0149728)AX191619中にあるのを見出した。表1は、配列タグ(TGCCGCATAA)のNK細胞由来ライブラリーにおける選択的な出現を表す。

[0141] [表1]

	未成熟樹状細胞	GM-CSF誘導性マクロファージ	LPS刺激性単球	成熟樹状細胞	M-CSF誘導性マクロファージ	単球	ランゲルハンス様細胞	CD4 T細胞(ナイーブ)	CD4 T細胞(メモリ、CCR4陰性)	CD4 T細胞(メモリ、CCR4陽性)	顆粒球	活性化T細胞(Th1)	活性化T細胞(Th2)	NK細胞
TGCCGCATAA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
全ての解析したタグ	50795	50041	30885	27602	46833	51228	44873	41789	27733	25415	23608	26498	25371	29878

[0142] これに基づきコーディング領域全体を増幅するプライマー(SA1(5'-TTGAATTCACACACCCACAGGACCTGCAGCTGAA -3'/配列番号:7)、SA2(5'-TTGGATCCACTGAAGGACCCACAGAAAGAGTTGA -3'/配列番号:8))を設計し、ヒト脾臓cDNAライブラリーよりPCRを用いて遺伝子をクローニングした。得られたクローンの塩基配列を配列番号:1に、該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:2に示す。また詳細な手順を以下に示す。

[0143] (1) pGEMTE_NK1の作成

以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型:marathon-ready cDNA human spleen(CLONTECH)

プライマー:SA1⇄SA2

反応条件:96℃で1分

96℃で30秒、72℃で4分、5サイクル

96℃で30秒、70℃で4分、5サイクル

96℃で20秒、68℃で4分、25サイクル

- [0144] TaKaRa Ex Taqを用いて(バッファー、dNTP mixtureは添付)PCRを行った。アガロースゲル電気泳動により約1.5kbのバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kitで精製した後、pGEM T-Easy Vectorに挿入しpGEMTE_NK1を作成した。塩基配列はプライマー-SA1ー7、T7、SP6を用いて確認した。

SA3:5'-ACCCTGAGATGTCAGACAAAG-3'／配列番号:9

SA4:5'-GCCACCTCACACCAGTAAAG-3'／配列番号:10

SA5:5'-CCTCCGATCCTGTATTCCTTC-3'／配列番号:11

SA6:5'-TGGAGCTGTGGGTGGTATCTG-3'／配列番号:12

SA7:5'-AGAACCTCAAAGAGGAGTGAA-3'／配列番号:13

T7プロモータープライマー:5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'／配列番号:14

SP6プロモータープライマー:5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'／配列番号:15

- [0145] (2)pCOS_NK1の作成

pGEMTE-NK1をEcoRI、BamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動により約1.5kbのバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kitで精製した後、pCOS1のEcoRI-BamHIサイトに挿入しpCOS-NK1を作成した。

- [0146] (3)pCHO2-NK1-FLAGの作成

以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型:pGEMTE-NK1

プライマー:SAS1(5'-GGGAATTCATGTTGCCATCTTTAGTTCC-3'／配列番号:16)⇔SAS2(5'-AAGGATCCACTCCTCTCTCTGGAGAC-3'／配列番号:17)

反応条件:94℃で2分

94℃で15秒、55℃で30秒、68℃で1分、25サイクル

- [0147] KOD plus (TOYOBO)を用いて(バッファー、dNTPs, MgSO₄は添付)PCRを行った。QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製後、EcoRI、BamHIで切断しアガロースゲル電気泳動により約1kbのバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kitで精製した後、pCHO2-FLAGのEcoRI-BamHIサイトに挿入し、pCHO2-NK1-FLAGを作成した。塩基配列はプライマー-SAS1、SAS2、S3、S4、S5、EF1α、polyAを用いて

確認した。

EF1 α : 5'-GCCTCAGACAGTGGTTCAAA-3' / 配列番号: 18

IgG1 polyA5'-AGAACCATCACAGTCTCGCA-3' / 配列番号: 19

[0148] (4)pCHO2-SGNK1-FLAGの作成

以下の反応条件でPCRを行った。

A: 鋳型: pCOS2-SGhMPL-FLAG

プライマー: Hmpl-sig1 (5'-AAGAATTCCACCATGGCTGGACCTGCCAC-3'
/ 配列番号: 20) \leftrightarrow NK1-sig2 (

5'-ACAGGGTTTGGCCAGGCTTGGGCTTCCTGCACTGTCCAGAG-3' / 配列番号: 21)

B: 鋳型: pGEMTE-NK1

プライマー: NK1-sig1 (5'-GCAGGAAGCCCAAGCCTGGCCAAACCCTGT -3'
/ 配列番号: 22) \leftrightarrow SAS2

C: 鋳型: 反応系AとB の産物を混合したもの

プライマー: Hmpl-sig1 \leftrightarrow SAS2

反応条件: 94°Cで2分

94°Cで15秒、55°Cで30秒、68°Cで1分、25サイクル

[0149] KOD plus (TOYOBO)を用いて(バッファー、dNTPs、MgSO₄は添付)PCRを行った。反応系CのPCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製後、EcoRI、BamHIで切断しアガロースゲル電気泳動により約0.9kbのバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kitで精製した後、pCHO2-FLAGのEcoRI-BamHIサイトに挿入しpCHO2-SGNK1-FLAGを作成した。塩基配列はPrimer-NK1-sig1、NK1-sig2、SAS2、S3、S4、S5、EF1 α 、polyAを用いて確認した。

[0150] 以上の(1)から(4)の工程により得られたクローンの塩基配列を決定したところ429アミノ酸からなる膜タンパク質と予想された。この配列を相模中研の配列(WO01/49728号)と比較したところ、中央部分の配列は相模中研の配列と同じであるが、N末は差が認められ、タンパク質配列にも差があることが判明した。今回クローニングしたクローンはC末端側は得られた全クローンで同一だったが、5'側はスプライスバリエントら

しきクローンも複数得られたため、本来の配列を確認するため以下のように5'RACEを行った。

[0151] NK細胞よりRNA-Bee_RNA ISOLATION REAGENT(Tel-Test)を用いて抽出したRNA($0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $20 \mu\text{l}$ in DEPC-DDW) $1 \mu\text{g}$ からSMART RACE cDNA Amplification Kit(CLONTECH)を用いてcDNA(5'-RACE-Ready cDNA, $100 \mu\text{l}$ in Tricine-EDTA Buffer)を合成し5'-RACE PCRを以下の反応条件で行った。

[0152] 1回目 鋳型: 5'-RACE-Ready cDNA, $2.5 \mu\text{l}$

プライマー: 10xUniversal Primera A Mix(添付、1xにて使用)⇔SAS2

10xUniversal Primer A Mix: (long, $0.4 \mu\text{M}$:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'／

配列番号: 23)

(short, $2 \mu\text{M}$: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'／配列番号: 24)

2回目 鋳型: 1回目PCR産物, $5 \mu\text{l}$

プライマー: Nested Universal Primer A (NUP)(

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'／配列番号: 25)⇔SA4

反応条件: 94°C で30秒

94°C で5秒、 72°C で3分、5サイクル

94°C で5秒、 70°C で10秒、 72°C で3分、5サイクル

94°C で5秒、 68°C で10秒、 72°C で3分、30サイクル

72°C で7分

[0153] 2回目PCRのPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、約650bpのバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kitで精製した後、pGEM T-Easy Vectorに挿入した。塩基配列をPrimer-SA3、4、T7、SP6、NUPを用いて確認した。

[0154] その結果、配列を確認した5クローン全てのコーディング配列が今回の塩基配列と一致した(うち、1クローンは5'が短かった)。従って、今回得たクローンが実際に発現している塩基配列であると考えられた。

[0155] Prosite、Pfam、Psort等によるモチーフ検索の結果より、以下のような配列上の特徴を検出した。

N型糖鎖付加部位(N^[P][ST]^[P]) 60 : NQTL , 245 : NHSA, 268 : NYSC

ITIMモチーフ (Yxx[VL]) 351:YANV, 366:YSVV

Ig様ドメイン 27-80, 120-177, 216-273

膜貫通ドメイン 309 - 325

[0156] 今回単離された遺伝子はFcRスーパーファミリーに属する古典的MHCクラスIをリガンドとして認識する抑制性受容体(KIR)メンバーであることが、上記の配列情報から推察された。この遺伝子はNK細胞に特異的に発現する特徴を有することから、以下ではNKIR遺伝子と呼称する。

[0157] [実施例2]ウサギポリクローナル抗体によるNKIRタンパク質の検出

大腸菌発現系を構築し、NKIR細胞外ドメインの融合タンパク質の発現精製を行った(図1)。詳細な手順を以下に示す。

[0158] (1)NKIR融合タンパク質大腸菌発現プラスミドpET32a-NK-solの作製

以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型:pGEMTE-NK1

プライマー:NKfusion (5'-CTCGGATCCTTGCCATCTTTAGTTCCTGTGTT
-3' / 配列番号:26) ⇔ NKr2 (

5'-GCTGTGCGACTTAGTTGCTGGCGGGAGTGAACAAGAC -3' / 配列番号:27)

反応条件:94℃で2分

94℃で20秒、60℃で30秒、68℃で2分、25サイクル

[0159] KOD plus(TOYOBO)を用いて(バッファー、dNTPs、MgSO₄は添付)PCRを行った。MicroSpin S-300 HRカラム(アマシャムバイオサイエンス)で精製後、BamHI、SalIで切断しアガロースゲル電気泳動により約0.9 kbのバンドを切り出した。MicroSpin S-300 HRカラムで精製した後、pET-32(a)(ノバジェン)のBamHI-SalIサイトに挿入しpET32a-NK-solを作製した。

[0160] (2)NKIRタンパク質動物細胞発現プラスミドpCOS2-NK-FLAGの作製

以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型:pGEMTE-NK1

プライマー:NKflag (

5'-GCGAATTCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTTGCCATCTT
TAGTTCCTGTGTT-3' / 配列番号: 28) ⇔ NKr1 (

5'-CGTGTCTGACTCACTAGCAGAGAACCTCCTCACAGTC -3' / 配列番号: 29)

反応条件: 94°Cで2分

94°Cで20秒、60°Cで30秒、68°Cで2分、25サイクル

- [0161] KOD plus (TOYOBO)を用いて(バッファー、dNTPs、MgSO₄は添付)PCRを行った。MicroSpin S-300 HRカラム(アマシャムバイオサイエンス)で精製後、EcoRI, SalIで切断しアガロースゲル電気泳動により約1.3 kbのバンドを切り出した。MicroSpin S-300 HRカラムで精製した後、pCOS2のEcoRI-SalIサイトに挿入し pCOS2-NK-FLAGを作製した。

- [0162] (3)NKIR融合タンパク質およびNKIRウサギポリクローナル抗体の調製

チオレドキシン融合タンパク質発現プラスミドpET32a-NK-solにより、大腸菌 BL21(DE3)の形質転換を行った。50 μg/mlアンピシリンを含むLB培地で終夜培養した大腸菌懸濁液を終濃度1%になるように50 μg/mlアンピシリンを含むLB培地へと拡大伝播して600nmでの吸光度が0.4になるまで培養を行った後、終濃度1mMになるようにIPTGを添加してタンパク質発現誘導を行った。4.5時間培養を行った後遠心して菌体沈殿物を回収、PBSに懸濁した。超音波破碎機により菌体破碎後に遠心し上清を捨て、沈殿画分を回収した。7M尿素を含むリン酸緩衝液(PBS)で可溶化した後、0.45 μmのフィルターろ過を行った。ろ液よりHisTrapキット(アマシャムバイオサイエンス)を用いて、NKIR融合タンパク質を分離した。溶出液を50mM Tris (pH 8.3)に対して透析して可溶化した融合タンパク質サンプルを得た。期待通りの分子量の融合タンパク質が得られていることをSDS-PAGE後のクマシー染色により確認した。

- [0163] 得られたNKIR融合タンパク質を免疫原としてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。抗原タンパク質を0.2mg/0.5mlに調製し、フロイント完全アジュバント(ベクトンディッキンソン)を0.5mlを加え1mlを皮内へ接種(1日、4日、11日)した。19日、26日、33日目に抗原タンパク質0.05mgを静注した。試採血を行い、抗体価があがっていることを確認後、採血を行い、抗血清をプロテインAアフィニティーカラムに供し抗体タンパク質を精製した。得られたポリクローナル抗体がCOS-7動物細胞で一過的

に発現したNKIRへの結合性を示すことを、以下のウエスタンブロッティングにより確認した。

[0164] FuGENE6(ロシュダイアグノティクス)を用いて製造者の指示に従い、pCOS2-NK-FLAG をCOS-7細胞へと導入した。2日間培養した後、細胞を可溶化液(10% グリセロール, 50mM Tris pH7.6, 150mM NaCl, 5mM NP-40, プロテアーゼ阻害剤 complete)を加え懸濁した後に遠心し、可溶化膜タンパク質成分が含まれる上清を得た。可溶化画分に抗FLAG M2抗体レジンを追加し、FLAG-NKIRを免疫沈降した。得られたサンプルをSDS-PAGE後に、PVDF膜へと転写し、抗NKIRポリクローナル抗体を用いて検出した。1次抗体としてウサギより得られたポリクローナル抗体(4.1 mg/ml IgG)を1000倍希釈にて、2次抗体としてHRP標識抗ウサギ抗体(アマシャムバイオサイエンス)を3000倍希釈にて使用した。検出にはECLウエスタンブロッティング検出システム(アマシャムバイオサイエンス)を用いた。また対照として抗FLAG M2抗体(シグマ)を1000倍希釈にて、2次抗体としてHRP標識抗マウス抗体(アマシャムバイオサイエンス)を3000倍希釈にて使用してFLAG-NKIRタンパク質の存在を確認した(図2)。

[0165] [実施例3] 組織発現解析及びNK細胞株における発現解析

市販cDNAパネル(Multiple Tissue cDNA (MTC) panel, Clontech Laboratories, Inc.)を鋳型に用いてPCRにより組織発現プロファイルを解析した。

[0166] 以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型:MTC panel I, II, Human Immune System及びHuman Blood Fraction(Clontech Laboratories, Inc.)

プライマー:NKIR07(5'-AGGTCAGAGTGCAGGCTCCTGTATC -3'/配列番号:30)⇔NKIR08(5'-TAGAACTGTCCTTTCTCCCCACGGT -3'/配列番号:31)

反応条件:94℃で30秒

94℃で30秒、65℃で2分、35サイクル

[0167] TaKaRa Ex Taqを用いて(バッファー、dNTP mixtureは添付)PCRを行った。反応は50 µlで行い反応液5 µlを1%アガロースゲル電気泳動に供し0.6 kb長バンドの出現を確認した。コントロール反応にはMTC panelに付属のG3PDH primerをプライマーに

使用した。

- [0168] その結果、脾臓、白血球といった免疫系に特異的に発現していることが示された(図3)。上記MTCパネルのBlood Fraction及びImmune Systemのサブセットを用いて解析対象を増やしたところBlood Fractionでは単核球、resting CD8⁺、またImmune Systemでは脾臓、白血球の他、リンパ節に局限した発現が確認された(図3)。
- [0169] 株化されたナチュラルキラー(NK)細胞株である、ATCCより購入したNK-92株(カタログ番号:CRL-2407)より調製した細胞溶解液を用いたウエスタンブロッティング解析を行った。
- [0170] NK-92株を10 ng/ml インターロイキン-2(SIGMA-ALDRICH)存在下、NK-92継代培地(12.5 % ウシ胎仔血清 (Invitrogen), 12.5 % ウマ血清 (Invitrogen), 2 mM グルタミン (Invitrogen), 0.1 mg/l ペニシリン(Invitrogen), 0.1 mg/l ストレプトマイシン (Invitrogen), 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen), 100 μ M 2-メルカプトエタノール (Invitrogen), 2 mM 葉酸 (SIGMA-ALDRICH) および 20 mM ミオ-イノシトール (SIGMA-ALDRICH)含有 α -MEM培地 (Invitrogen))にて培養し得られた 1×10^7 cellsを500 μ lのNP40溶解バッファー(1 % NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH8.0))に懸濁し、氷上で30分静置後15000rpmのマイクロ遠心にて上清を分画し、細胞溶解液としてウエスタンブロッティング解析に用いた。
- [0171] 細胞溶解液のタンパク質濃度をPIERCE製のウシ血清アルブミン(Fraction V)をコントロールとしてDc Protein Assay Kit (BIO-RAD Laboratories)を用いて測定し決定した。
- [0172] ウエスタンブロッティング解析の為のSDS-PAGEにはPAG-Mini(4-20% gradient gel、第一化学薬品株式会社)を用いて10 μ g及び20 μ gのNK-92株の細胞溶解液を供した。ポジティブコントロールとしてポリクローナル抗体調製用にウサギに免疫した際に使用した免疫源をNP40溶解バッファーにて200倍に希釈した標品1 μ lを同時に供した。電気泳動は20mAの条件で行い、泳動後のゲルをSEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD Laboratories)を用いて20 voltsにて45分の条件でPVDF膜(Hybond-P, Amersham Biosciences)に転写した。ウエスタンブロッティングはECL+plus Western Blotting Detection System(Amersham Biosciences)を用いてマニ

ュアルの方法に従い行った。但し、ブロッキング試薬にはECL-Advance blocking agent (Amersham Biosciences)を2 %濃度で用いた。1次抗体として前述のウサギより得られたポリクローナル抗体(4.1 mg/ml IgG)を1000倍希釈にて、また2次抗体として抗ウサギ Ig, horseradish peroxide linked whole antibody (ロバ由来) (Amersham Biosciences)を3000倍希釈にて使用し、抗NKIRポリクローナル抗体に対して交叉する分子種を確認した。

[0173] その結果、大腸菌で発現したNKIR蛋白をウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体に交叉するおよそ60kDaの分子量を有するタンパク質がNK-92株で発現していることが示された(図4)。

[0174] さらに、本NKIR分子がNK細胞表面に発現していることを確認するために、抗NKIRポリクローナル抗体を用いたNK-92株のフローサイトメトリー解析を行った。

[0175] 5×10^5 細胞を100 μ lのFACSバッファー(2.5 %ウシ胎仔血清、0.02 % NaN_3 inリン酸緩衝生理食塩水)に懸濁後、終濃度82 μ g/mlになるように抗NKIRポリクローナル抗体を添加した。ネガティブコントロールとして同濃度のウサギ精製IgGを添加した細胞も調製した。氷上1時間静置後、低速遠心(300 x g, 5 min.)にて細胞を回収し、FACSバッファーにて洗浄して再度低速遠心にて細胞を回収した。次にヤギ由来FITCコンジュゲート抗ウサギIgG抗体(Beckman Coulter)を終濃度14 μ g/mlで含むFACSバッファーにて回収した細胞を懸濁後、氷上にて30分静置した。低速遠心での細胞回収、並びにFACSバッファーによる洗浄を行った後500 μ lのFACSバッファーに懸濁してフローサイトメトリー解析(Beckman Coulter, EPICS)を行った。結果、本NKIR分子が細胞表面に発現していることが示された(図5)。

[0176] [実施例4] NK-92株由来cDNAを用いたRACE法によるNKIR遺伝子の全長クローニング

NK-92株より調製した全RNAを用いて5'-並びに3'- RACE法により再度NKIR遺伝子の全長クローニングを行った。

[0177] 実施例3に記載の方法で培養された 5.4×10^7 のNK-92細胞より全RNAをRNeasy(QIAGEN)キットを用いて調製し、377.7 μ gの全RNAを得た。このように調製した1 μ gのRNAを鋳型として、SMART RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)を使用して

5'-RACE並びに3'-RACEを行った。遺伝子特異的なプライマーとして、5'-RACEではNKIR08を、3'-RACEではNKIR07を用いた。両反応共に1次PCR反応にておよそ1.3 kb長の主要増幅産物が得られたため、本増幅断片をアガロースゲルより切り出しQIAquick (QIAGEN) キットを用いて精製後、pCR2.1-TOPO (Invitrogen) ヘクローニングした。生じたTOP10F'由来の形質転換株各8株を2 mlの0.1 mg/mlアンピシリンを含むLB培地にて培養し、培養大腸菌よりプラスミドをQIAprepキット (QIAGEN) を用いて調製し配列を決定した。その結果、5'-RACE反応からは、これまで確定していた配列以外に5'末端に36塩基長い挿入を有するcDNA配列が得られ、pTOPONKIR626として以後の検討に用いた。また、3'-RACEからはおよそ500塩基下流に伸長しているcDNAクローン、pTOPONKIR620が得られた。この塩基配列を配列番号:3として、また該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:4として配列表中に示す。該配列がヒトゲノム上1番染色体のNKIR領域に確認された。

[0178] そこで、5'端の36塩基の挿入配列に着目して、実施例1で割り当てた配列と新たに単離した配列とをそれぞれ有する発現ベクターを、ベクター骨格としてpCOS1を用いて構築しCOS-7細胞に一過性発現させた。

[0179] pGEM-TE NK1を鋳型にしてNKIR09 (5'-GAATTCACACACCCACAGGACCTGCA -3' / 配列番号:32) 及びNKIR10 (5'-GGATCCACTGAAGGACCCACAGAAAG -3' / 配列番号:33) プライマーを共に0.2 μ M用いてPCRを行った。PCRキットはHF polymerase kit (Clontech) を用いて行い、反応条件として94℃で30秒の変性の後、94℃、15秒 + 55℃、30秒 + 72℃、1分のサイクルを25サイクルの後、72℃で5分の伸長反応を行った。反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、生じた1.5 kb断片をQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した後pCR2.1-TOPO (Invitrogen) ヘクローニングし大腸菌株TOP10F'を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株よりプラスミドをQIAprep miniprep kit (QIAGEN) を用いて調製し配列解析を行った。PCRエラーのないクローン、pTOPONKIR219を以後の検討に選択した。

[0180] 次に5 μ gのpTOPONKIR219並びに1.15 μ gのpBluescript IISK+ (Stratagene) を各々20unitsのEcoRI並びにBamHIにて37℃、1時間消化した後アガロースゲル電気泳

動に供しそれぞれ生じた1.5 kb及び3.0 kbの断片をQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)を使用して精製した後40 μ lの溶出液の内それぞれ1 μ lをLigaFAST Ligation kit (Promega)を用いてライゲートし、大腸菌株TOP10F'を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株よりプラスミドをQIAprep miniprep kit (QIAGEN)を用いて調製し、PstI消化により制限チェックし1.3 kb長の消化断片が観察されたクローン、pBSNKIR224を以後の検討に用いた。続いてpBSNKIR224及びpTOPONKIR626のBstP1並びにBglII二重消化から生じたそれぞれ4 kb及び0.4 kb断片をアガロースゲル電気泳動により単離しQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)により精製した後LigaFAST Ligation kit (Promega)を用いてライゲートし大腸菌株DH5 α を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株よりプラスミドをQIAprep miniprep kit (QIAGEN)を用いて調製し、配列解析を行い、5'端に36 bp挿入が認められたクローン、pBSNKIRfull605を以後の検討に使用した。

[0181] 最後に、pBSNKIR224並びにpBSNKIRfull605由来の1.4 kb長EcoRI - NotI断片をpCOS1のEcoRI - NotIサイトに挿入し、それぞれ発現ベクターpCOSNKIR610及びpCOSNKIRfull610を作成した。両プラスミドを供与DNAとしてMIRUS TransIT-LT1 (PanVera)を用いたリポフェクション法にて製造者の指示に従いCOS-7細胞に形質導入を行い2日間培養した後、トリプシン/EDTA溶液 (Invitrogen)を用いて細胞を剥離後10 % ウシ胎仔血清 (Invitrogen) 含有DMEM培地 (Invitrogen) にて細胞を2回洗浄し、実施例3に記載された方法と同一の手順でフローサイトメトリー解析を行った。

[0182] 結果、NK-92より単離された5'端に36塩基の挿入を有する配列を持つNKIR発現プラスミドでトランスフェクションを行った場合でのみ、FITC検出でシフトする細胞画分が認められたことから、36塩基の挿入を有するクローンが分泌型として機能することが示された(図6)。

[0183] [実施例5] マウスNKIR配列のクローニング

ヒトNKIRアミノ酸配列をqueryにしたマウスゲノム配列に対するblast検索(tblastn)を行い、全長配列にわたってヒットする一番染色体領域を同定した(図7)。このマウス染色体領域はヒトNKIRがマップされるヒト染色体領域と染色体構造上もマッチする領域である。

- [0184] 予想翻訳領域に基づきプライマー (mNKIRf1 (5'-CTCAGTAAAGGCAGAGTGGAGTACC-3' / 配列番号: 34) ⇔ mNKIRr1 (5'-ATACATTAGAACCACAGCCGCAATG-3' / 配列番号: 35)) を設計し、マウス脾臓 cDNA ライブラリーより PCR 増幅を行い、遺伝子をクローニングした。その配列確認を行った結果、スプライシングを受けた転写物の存在を同定できた。
- [0185] マウス脾臓 Marathon-Ready cDNA (Clontech) を鋳型に 5'-RACE, 3'-RACE PCR は以下の反応条件で行った。
- 1回目: 鋳型: Marathon Ready cDNA, 2.5 μ l
- プライマー:
- AP1 (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC -3' / 配列番号: 36) ⇔ mNKIRf1 for 3' RACE
- AP1 ⇔ mNKIRr1 for 5' RACE
- 2回目: 鋳型: 1回目 PCR 産物を 30 倍希釈したもの, 2.5 μ l
- プライマー:
- AP2 (5'- ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3' / 配列番号: 37) ⇔ mNKIRf3 (5'-CTCAAGAAGTTCCCCTTGGTTGTCTC-3' / 配列番号: 38) for 3' RACE
- AP2 ⇔ mNKIRr3 (5'- GCCAGATAGTTAGCATGTTGCTCTTG-3' / 配列番号: 39) for 5' RACE
- 1回目 PCR
- 反応条件: 94°C で 1 分
- 94°C で 10 秒、68°C で 3 分、35 サイクル
- 2回目 PCR
- 反応条件: 94°C で 1 分
- 94°C で 10 秒、68°C で 3 分、20 サイクル
- [0186] TaKaRa LA Taq (TAKARA) を用いて (バッファー、dNTPs, MgCl₂ は添付) 製造者の指示に従い反応液を調製して PCR を行った。2回目 PCR の PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、増幅されたバンドを切り出した。QIAquick Gel Extraction Kit で精製した後、pGEM T-Easy Vector に挿入した。DH5 α を形質転換し、得られたクローンよりプ

ラスミドを調製して塩基配列を決定した。

[0187] その結果、268アミノ酸からなる膜タンパク質と予想された。得られたクローンの塩基配列を配列番号:5として、また該塩基配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号:6として配列表中に示す。ヒト-マウス配列の比較(図8)では、マウス配列はヒトの配列と比べ、N末端、C末端ともに切り詰めた構造をもっているが、ひとつのN型糖鎖付加部位、ひとつのITIMモチーフ、膜貫通ドメイン、二つのIg様ドメインを相当する領域に保持していた。

[0188] Prosite, Pfam, Psort等によるモチーフ検索の結果より、以下のような配列上の特徴を検出した。

N型糖鎖付加部位(N^[P][ST]^[P]) 180 : NYSC, 188 : NISR

ITIMモチーフ (Yxx[VL]) 259:YANV

Ig様ドメイン 33-89, 128-185

膜貫通ドメイン 221 - 237

[0189] [実施例6] 2KIR3DLのクローニング

ITIM活性の検出アッセイ系はT細胞を受容細胞として用いたNFATカスケード制御下のルシフェラーゼ活性を測定する方法を改変して実施した(Fry AM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300)。

[0190] ヒト脾臓cDNAライブラリーを用いて既知のKIR遺伝子である2KIR3DLをクローニングした。以下の反応条件でPCRを行った。

鋳型: Human Spleen Marathon-Ready cDNA (Clontech)

プライマー: p58KIR01 (5'- GAATTCATGTCGCTCATGGTCGTCAG -3' / 配列番号:40) ⇔ p58KIR02 (5'- GGATCCTCAGGGCTCAGCATTTGGAA -3' / 配列番号:41)

反応条件: 94℃で30秒

94℃で15秒、52℃で30秒、72℃で1分、30サイクル

72℃で5分

[0191] HF polymerase(Clontech)を用いてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にて1 kb長の断片を分離後QIAquick(QIAGEN)にて精製した。精製産物をpCR2.1-TOPO

にクローニングして大腸菌TOP10F'を形質転換した。QIAprep(QIAGEN)キットを用いて形質転換株よりプラスミドを調製しPCRエラーのない配列を有するクローン(pTOPO58KIR303)を選択し更なる検討に用いた。

[0192] [実施例7] インフレーションフュージョンの構築

上記実施例6で得られた2KIRDL3の細胞外ドメインとNKIRの細胞質内ITIMモチーフとのインフレーションフュージョンを以下の手順で構築した。

[0193] まず以下の反応条件でフュージョンPCRを行った。

1回目PCR A

鋳型:pTOPO58KIR303

プライマー:p58KIR01 ⇔ p58NKIR04 (5'-

AGGGGCCCAGCTTTTCTCCAGCGATGAAGGAGAAAGAAGA -3' / 配列番号:42)

1回目PCR B

鋳型:pBSNKIR224

プライマー:p58KIR03 (5'-

TCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGAGAAAAGCTGGGCCCCT -3' / 配列番号:43) ⇔ T3+ (5'- GCAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC -3' / 配列番号:44)

反応条件は共に下記記載の条件で行った。

94℃で30秒

94℃で15 秒、55℃で30秒、72℃で45 秒、30サイクル

72℃で2 分

[0194] HF polymerase(Clontech)を用いてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にてPCR Aより0.8 kb長の断片、PCR Bより0.4 kb長の断片を分離後QIAquick(QIAGEN)にて精製した。精製産物50 μlの内それぞれ10 μlを下記に示す2回目PCRの鋳型として用いた。

鋳型:上記反応産物各10 μl

反応条件は下記記載の条件で行った。

94℃で30 秒

94℃で15 秒、55℃で30秒、72℃で90 秒、15サイクル

[0195] 反応後、反応液50 μ lに最終濃度1 μ Mの下記に記すテンプレートを添加した。

プライマー:p58KIR01 \leftrightarrow T3+

反応条件:94℃で30秒

94℃で15 秒、55℃で30 秒、72で2 分、35サイクル

72℃で4 分

[0196] アガロースゲル電気泳動にて1.2 kb長の断片を分離後QIAquick(QIAGEN)にて精製した。pCR2.1-TOPOにクローニングして大腸菌TOP10F'を形質転換した。

QIAprep(QIAGEN)キットを用いて形質転換株よりプラスミドを調製しPCRエラーのない配列を有するクローン(pBSKIR58NKIR314)を選択し更なる検討に用いた。

[0197] 次に1 μ gのpCXND3並びにpBSKIR58NKIR314を各々20 unitsのEcoRI並びにNotIにて37℃、1時間消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、それぞれ生じた7.8 kb及び1.2 kbの断片をQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)を使用して精製した後、40 μ lの溶出液の内それぞれ1 μ lをLigaFAST Ligation kit (Promega)を用いてライゲートし、大腸菌株DH5 α を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株をピックアップしp58KIR01そしてp58NKIR10プライマーを各々0.5 μ Mずつ用いてコロニーPCRを行った。この際PCRポリメラーゼとしてPremix ExTaq (Takara)を用い、反応条件は94℃で5分の変性の後、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒の反応を35 サイクル行った。生じた反応産物の1/5量をアガロースゲル電気泳動に供して1.3 kb長のPCR断片が観察されたクローンpCXND3KIR58NKIR313を以後の検討に用いた。

[0198] [実施例8] 安定形質導入株取得

上記実施例7で得られたpCXND3KIR58NKIR313を供与DNAとして用いて、T細胞株であるJurkat株から安定形質導入株候補株であるChimeraA10株を取得した。取得手順を以下に記す。

[0199] pCXND3KIR58NKIR313を供与DNA、Jurkat株を受容細胞に用いてエレクトロポレーション法による形質導入を行った。20 μ gの供与DNAは予め20 unitsのPvuII (Takara)にて37℃で1時間消化し、クロロホルムフェノール処理に続いてエタノール沈殿した後20 μ lの滅菌水に溶解した。受容細胞としては10%FBS含有RPMI1640培地

にて継代したJurkat細胞をPotassium-Based Phosphate buffered saline (K-PBS)にて洗浄後 10^7 細胞 / ml K-PBS の細胞懸濁液0.8 mlを調製した。エレクトロポレーションにはGene Pulsar II (Bio-Rad)を使用しパルス条件は0.3 kV、950 μ FDで行った。パルス負荷後48 mlの継代培地に懸濁し選択圧のない条件で終夜培養した後、最終濃度400 μ g/mlのGeneticin (Invitrogen)による選択圧をかけ、安定形質導入株候補株であるChimeraA10株を取得した。一次抗体としてGL183モノクローナル抗体(Beckman Coulter)及び二次抗体としてFITCコンジュゲート抗ウサギIgG抗体(Beckman Coulter)を用いる以外は、実施例3に記載された方法と同様の手順でフローサイトメトリー解析を行った。

[0200] その結果、FITC染色された細胞画分が認められ、ChimeraA10株において上記融合タンパク質が発現していることが示された(図9)。

[0201] [実施例9] 二重形質導入株の作成

上記実施例8で得られたChimeraA10株を受容細胞にして、ルシフェラーゼレポータープラスミドpNFATlucZEOR324を形質導入して、二重形質導入株を取得した。pNFATlucZEOR324は以下のようにして構築した。

[0202] Mercury Pathway Profiling Luciferase system 2 (Clontech)に含まれるルシフェラーゼレポーター遺伝子pNFAT-TA-Luc 2.5 μ gを20 unitsのAccI (Takara)で、またdam株であるSCS-110株(Stratagene)より調製した5 μ gのpCOSIIIZEOを20 unitsのClaI (Takara)にて37°Cで1時間消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。それぞれ5 kb、2.2 kb長の消化断片をGel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製し、pNFAT-TA-Luc由来の断片はCalf intestine alkaline phosphatase処理を37°Cにて30分行った後に、QIAquick nucleotide removal kit (QIAGEN)を用いて精製した。両断片をLigaFAST Ligation kit (Promega)を用いてライゲートし大腸菌株DH5 α を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株よりプラスミドをQIAprep miniprep kit (QIAGEN)を用いて調製しEcoRI及びSalI二重消化により制限チェックし、4.15 kb及び3.15 kb長の消化断片が観察されたクローンを正向き挿入クローンpNFATlucZEOR324として、また5.15 kb及び2.15 kb長の消化断片が観察されたクローンを逆向き挿入クローンpNFATlucZEOR324として以後の検討に用いた。

[0203] そのpNFATlucZEOR324を供与DNA、chimeraA10株を受容細胞に用いて、エレクトロポレーション法による形質導入を行った。20 μ gの供与DNAは予め20 unitsのPvuII (Takara)にて37°Cで1時間消化した後、クロロホルムフェノール処理に続いてエタノール沈殿した後に20 μ lの滅菌水に溶解した。受容細胞としては10 %FBS及び400 μ g/ml geneticin含有RPMI1640培地にて継代したchimeraA10細胞をPotassium-Based Phosphate buffered saline (K-PBS)にて洗浄後 10⁷ 細胞 / ml K-PBS の細胞懸濁液 0.8 mlを調製した。エレクトロポレーションにはGene Pulsar II (Bio-Rad)を使用し、パルス条件は0.3 kV、950 μ FDで行った。パルス負荷後48 mlの400 μ g/ml geneticin含有継代培地に懸濁し選択圧のない条件で終夜培養後に、最終濃度100 μ g/mlのzeocin (Invitrogen)による選択圧をかけ、安定形質導入株候補株を取得した。得られたZeocin耐性株よりゲノムDNAをDNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて調製した。最終溶出液0.4 mlの内、5 μ lを鋳型に用いてPCR反応を行った。PCRポリメラーゼとしてPremix ExTaq、プライマーにはLuc01 (5'- TTCATACAGAAGGCGTGGAG -3' / 配列番号:45)とLuc02 (5'- CGTTCGCGGGCGCAACTGCA -3' / 配列番号:46)を用い、反応条件は94°Cで5分の変性の後、94°Cで15 秒, 55°C で 30 秒, 72°Cで45秒の反応を25サイクル行った後に、72°Cで5分の伸長反応を加えた。アガロースゲル電気泳動にて0.5 kb長のPCR断片を生じるクローンを選択し、ルシフェラーゼ活性検出による最終スクリーニングを行った。

[0204] ルシフェラーゼアッセイはchimeraA10細胞株より得られたpNFATlucZEOR324の安定形質導入候補株を6.7 x 10⁴細胞 / mlの濃度で400 μ g/ml geneticin及び100 μ g/ml zeocin含有継代培地に懸濁後、抗ヒトCD3コーティングマイクロプレート (Beckton Dickinson)そして通常のイムノマイクロプレート中に75 μ l / wellで播種し実施した。37°Cにて20時間培養後、同量(75 μ l)のDual-Glo Luciferase Buffer (Promega)を添加し10分静置した後に化学発光をルミノメーターMicroLumat LB96P (EG&G Berthold)にて各ウェルあたり5秒間測定した。

抗ヒトCD3コーティングマイクロプレート培養下でのみ強い化学発光を示す株 chimeraA10ZEOR12株を安定形質導入株として選択した。また本株に対して上記の方法と同一の手順でフローサイトメトリー解析を行った。

[0205] その結果、ChimeraA10株において発現していた融合タンパク質発現を保持していることを示した(図9)。

[0206] [実施例11]NKIR由来のITIM活性測定

chimeraA10ZEOR12株を用いてNKIR由来のITIMモチーフの機能評価を行った。方法を以下に示す。

[0207] chimeraA10ZEOR12株を400 μ g/ml geneticin及び100 μ g/ml zeocin含有継代培地に5 x 10⁵細胞 / mlの濃度で懸濁し、抗ヒトCD3コーティングマイクロプレート(Beckton Dickinson)に各ウェルあたり100 μ lずつ播種した。37℃にて6時間培養後、終濃度1 μ g/mlのGL183抗体(Beckman Coulter)を添加し37℃にて終夜培養を行った。次に400 μ g/ml geneticin及び100 μ g/ml zeocin含有継代培地にて2回洗浄後、ラット由来抗マウスIgG抗体をそれぞれ0、2、10 μ g/mlの濃度で含有する培地100 μ lに洗浄細胞を懸濁後実施例10に記載の方法と同様の手順にてルシフェラーゼ活性を測定した。

[0208] その結果、ラット由来抗マウスIgG抗体でクロスリンクすることによりルシフェラーゼ活性を3例の平均で33.3 %阻害することが示され(図10)、NKIR分子の細胞質内ドメインに見出されるITIMモチーフがITIM活性を有することが示された。

[0209] [実施例12] CD8 α 鎖のクローニング

ITIM活性の機能アッセイ系は実施例6と同様、T細胞を受容細胞として用いたNFATカスケード制御下のルシフェラーゼ活性を測定する方法を改変して実施した(Fry AM, Lanier LL, Weiss A., J Exp Med. (1996), 184, 295-300)。

[0210] resting CD8+ Marathon cDNA library(Clontech)を鋳型にして既知のCD8 α 鎖遺伝子をクローニングした。以下の反応条件でPCRを行った。

プライマー:CD01(5'-GAATTCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3' / 配列番号:47) \leftrightarrow CD02(5'-GGATCCTTAGACGTATCTCGCCGAAA-3' / 配列番号:48)

反応条件:94℃で30秒

94℃で15秒、50℃で30秒、72℃で30秒、30サイクル

72℃で4分

[0211] GC polymerase(宝酒造)を用いてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にて0.7

kb長の断片を分離後QIAquick (QIAGEN)にて精製した。精製産物をpCR2.1-TOPOにクローニングして大腸菌TOP10F'を形質転換した。QIAprep (QIAGEN)キットを用いて形質転換株よりプラスミドを調製しPCRエラーのない配列を有するクローン(pCD8full0113)を選択し更なる検討に用いた。

[0212] [実施例13] CD8-NKIRフュージョンタンパク質発現ベクターの構築

上記実施例12で得られたCD8 α 鎖の細胞外ドメインとNKIRの細胞質内ITIMモチーフとのフュージョンタンパク質発現ベクターを以下の手順で構築した。

[0213] まず以下の反応条件でフュージョンPCRを行った。

1回目PCR A

鋳型:pCD8full0113

プライマー:CD03(5'-GAATTCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGC-3'/配

列番号:49)⇔CDNKIR12(5'-

ACCAGCCAGTTGCTGGCGGGGTCCAGCCCCCTCGTGTGCA-3'/配列番号:50)

1回目PCR B

鋳型:pBSNKIR224

プライマー:CDNKIR11(5'-

TGCACACGAGGGGGCTGGACCCCGCCAGCAACTGGCTGGT-3')/配列番号:51)⇔T3+(配列番号:44)

反応条件は共に下記記載の条件で行った。

94℃で30秒

94℃で15秒、55℃で30秒、72℃で1分、30サイクル

72℃で4分

[0214] GC polymerase(宝酒造)を用いてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にてPCR Aより0.5 kb長の断片、PCR Bより0.6 kb長の断片を分離後QIAquick (QIAGEN)にて精製した。精製産物50 μ lの内それぞれ10 μ lを下記に示す2回目PCRの鋳型として用いた。

鋳型:上記PCR A及びPCR B反応産物各10 μ l

反応条件は下記記載の条件で行った。

94℃で30秒

94℃で15秒、55℃で30秒、72℃で90秒、15サイクル

[0215] 反応後、反応液50 μ lに最終濃度1 μ Mの下記に記すプライマーを添加した。

プライマー: CD03 \leftrightarrow T3+

反応条件: 94℃で30秒

94℃で15秒、55℃で30秒、72で30秒、35サイクル

72℃で4分

[0216] アガロースゲル電気泳動にて1.1 kb長の断片を分離後QIAquick (QIAGEN)にて精製した。pCR2.1-TOPOにクローニングして大腸菌TOP10F'を形質転換した。

QIAprep (QIAGEN) キットを用いて形質転換株よりプラスミドを調製しPCRエラーのない配列を有するクローン(pTOPOCD8NKIRfull)を選択し更なる検討に用いた。

[0217] 次に1 μ gのpCXND3並びにpTOPOCD8NKIRfullを各々 20 unitsのEcoRI並びにNotIにて37℃、1時間消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、それぞれ生じた7.8 kb及び1.1 kbの断片をQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)を使用して精製した後、40 μ lの溶出液の内それぞれ1 μ lをLigaFAST Ligation kit (Promega)を用いてライゲートし、大腸菌株DH5 α を形質転換した。生じたアンピシリン耐性株をピックアップし正しい1.1 kb長の挿入が観察されたクローンpCXND3CD8NKIRfullを以後の検討に用いた。

[0218] [実施例14] CD8-KIRフュージョンタンパク質発現ベクターの構築

上記実施例12で得られたCD8 α 鎖の細胞外ドメインとKIRの細胞質内ITIMモチーフとのフュージョンタンパク質発現ベクターを以下の手順で構築した。本コンストラクトはITIM機能アッセイのポジティブコントロールとして用いられる。

[0219] まず以下の反応条件でフュージョンPCRを行った。

1回目PCR A

鋳型: pCD8full0113

プライマー: CD03 (配列番号: 49) \leftrightarrow CDKIR12 (5' -

ATCAGAACATGCAGGTGTCTTCCAGCCCCCTCGTGTGCA -3') / 配列番号: 5

2)

1回目PCR B

鋳型:pBSKIR306

プライマー:CDKIR11(5'-

TGCACACGAGGGGGCTGGACAGACACCTGCATGTTCTGAT -3')/配列番号
:53) ⇔ T3+ (配列番号:44)

反応条件は共に下記記載の条件で行った。

94℃で30秒

94℃で15秒、55℃で30秒、72℃で1分、30サイクル

72℃で4分

[0220] GC polymerase(宝酒造)を用いてPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にてPCR Aより0.5 kb長の断片、PCR Bより0.4 kb長の断片を分離後QIAquick (QIAGEN)にて精製した。精製産物50 μ lの内それぞれ10 μ lを下記に示す2回目PCRの鋳型として用いた。

鋳型:上記PCR A及びPCR B反応産物各10 μ l

反応条件は下記記載の条件で行った。

94℃で30 秒

94℃で15 秒、55℃で30秒、72℃で90 秒、15サイクル

[0221] 反応後、反応液50 μ lに最終濃度1 μ Mの下記に記すプライマーを添加した。

プライマー:CD03 ⇔ T3+

反応条件:94℃で30秒

94℃で15 秒、55℃で30 秒、72℃で30秒、35サイクル

72℃で4 分

[0222] アガロースゲル電気泳動にて0.9 kb長の断片を分離後QIAquick (QIAGEN)にて精製した。pCR2.1-TOPOにクローニングして大腸菌TOP10F'を形質転換した。

QIAprep (QIAGEN)キットを用いて形質転換株よりプラスミドを調製しPCRエラーのない配列を有するクローンの0.9 kb長のEcoRI-NotI挿入断片をpCXND3のEcoRI-NotIに挿入しpCXND3CD8KIRfullを得て以後の検討に用いた。

[0223] 〔実施例15〕 NFAT-ルシフェラーゼレポーター安定発現細胞株の樹立

実施例9で得られたLuciferaseレポータープラスミドであるpNFATlucZEOF324を供与DNAに、そしてJurkat株を受容細胞に用いてエレクトロポレーション法による形質導入を行った。20 μ gの供与DNAは予め20 unitsのPvuII (Takara) にて37°Cで1時間消化した後、クロロホルムフェノール処理に続いてエタノール沈殿した後に20 μ lの滅菌水に溶解した。受容細胞としては10 %FBS含有RPMI1640培地にて継代したJurkat細胞をPotassium-Based Phosphate buffered saline (K-PBS) にて洗浄後 10⁷ 細胞 / ml K-PBS の細胞懸濁液0.8 mlを調製した。エレクトロポレーションにはGene Pulsar II (Bio-Rad)を使用し、パルス条件は0.3 kV、950 μ FDで行った。パルス負荷後48 mlの継代培地に懸濁し選択圧のない条件で終夜培養後に、最終濃度100 μ g/mlのzeocin (Invitrogen)による選択圧をかけ、安定形質導入株候補株を取得した。得られたZeocin耐性株よりゲノムDNAをDNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて調製した。最終溶出液0.4 mlの内、5 μ lを鋳型に用いてPCR反応を行った。PCRポリメラーゼとしてPremix ExTaq、プライマーにはLuc01 (5'- TTCATACAGAAGGCGTGGAG -3' / 配列番号:45)とLuc02 (5'- CGTTCGCGGGCGCAACTGCA -3' / 配列番号:46)を用い、反応条件は94°Cで5分の変性の後、94°Cで15秒、55°Cで30秒、72°Cで45秒の反応を25サイクル行った後に、72°Cで5分の伸長反応を加えた。アガロースゲル電気泳動にて0.5 kb長のPCR断片を生じるクローンを選択し、ルシフェラーゼ活性検出による最終スクリーニングを行った。

[0224] ルシフェラーゼアッセイはJurkat細胞株より得られたpNFATlucZEOF324の安定形質導入候補株を6.7 x 10⁴細胞 / mlの濃度で100 μ g/ml zeocin含有継代培地に懸濁後、抗ヒトCD3コーティングマイクロプレート (Beckton Dickinson)そして通常のイムノマイクロプレート中に75 μ l / wellで播種し実施した。37°Cにて20時間培養後、同量(75 μ l)のDual-Glo Luciferase Reagent (Promega)を添加し10分静置した後に化学発光をルミノメーターMicroLumat LB96P (EG&G Berthold)にて各ウェルあたり5秒間測定した。

抗ヒトCD3コーティングマイクロプレート培養下でのみ強い化学発光を示すF11株を安定形質導入株として選択した。

[0225] [実施例16] 二重形質導入株の作成

上記実施例15で得られたF11株を受容細胞にして、上記実施例13で得られたCD8-NKIRフュージョン、pCXND3CD8NKIRfull及び上記実施例14で得られたCD8-KIRフュージョン、pCXND3CD8KIRfullを形質導入して、二重形質導入株を取得した。

[0226] pCXND3CD8NKIRfullそしてpCXND3CD8KIRfull各20 μ gを20 unitsのPvuI (宝酒造)を用いて37°Cにて2時間消化したものを等量のフェノールクロロホルム(50% (v/v)、ナカライテスク)にて精製し1/10量の3 M酢酸ナトリウム(ナカライテスク)と2倍量のEthanol(ナカライテスク)を用いて沈殿後、風乾したサンプルを20 μ lの滅菌水に溶解したものを使用した。Electroporation及びそれに続く樹立の際の手順は継代培地としては100 μ g/ml濃度のzeocinと10% (v/v) 非働化した仔牛血清及び1% (v/v) Penicillin及びStreptomycin溶液を含有するRPMI 1640培地を使用し、選択薬剤としてgeneticin 700 μ g/ml濃度で実施した以外は実施例9と同一の条件で実施した。得られた単コロニー由来の薬剤耐性クローンを抗CD8-FITC抗体(Becton Dickinson)を使用してFACS解析を行うことにより発現クローンを各々6〜8クローン選択した。

[0227] これら形質導入株について実施例15に記載されたレポーター活性測定により、レポーター活性を保持したCD8キメラクローンを最終的に3クローン(pCXND3CD8NKIRfullの形質導入株としてNKIR#16及びNKIR#19、pCXND3CD8KIRfullの形質導入株としてKIR#24)を選択した。これら3クローンのCD8キメラの構造を図11-1に示す。図11-2には実施例17で使用する抗CD8抗体、LT8 (Serotec)とヤギ抗マウスIgG-FITCコンジュゲート抗体(Coulter)を用いたこれらクローンのFACS解析の結果を示す。CD8キメラクローンは3株ともLT8特異的な染色が観察された。

[0228] [実施例17] NKIR由来のITIM活性測定

実施例16で得られた二重形質導入株NKIR#16、NKIR#19及びKIR#24とその宿主であるF11株を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを実施しNKIR由来のITIM活性測定を行った。

[0229] 宿主F11株を継代培地(100 μ g/ml濃度のzeocinと10% (v/v) 非働化した仔牛血清

及び1% (v/v) Penicilin及びStreptomycin溶液を含有するRPMI 1640培地)にて生育させた。CD8キメラクローンは700 μ g/ml濃度のgeneticinを含有する上記培地で生育させた。それぞれの増殖培地にて 5.33×10^5 cells/mlに懸濁後、37.5 μ lずつをFlat bottom 96-well plateに分注し37°Cにて16時間培養した。一次抗体として6 μ g/mlにそれぞれの増殖培地にて希釈した抗CD8抗体(LT8, Serotec, MCA1226XZ)を12.5 μ l(終濃度1.5 μ g/ml)ずつ添加した。対照群には抗体を含まない各増殖培地を加えた。37°Cにて1時間培養後、クロスリンカーとして6 μ g/mlにそれぞれの増殖培地にて希釈したウサギ抗マウスIgG1抗体(H143.225.8, Southern Biotech, 1145-01)を12.5 μ l(終濃度1.2 μ g/ml)ずつ添加した。対照群には抗体を含まない各増殖培地を加えた。37°Cにて1時間培養後、240 μ g/mlに各増殖培地にて希釈したConA(SIGMA)を12.5 μ l(終濃度40 μ g/ml)ずつ添加した。37°Cにて8時間及び10時間培養後、等量(75 μ l)のluciferase reagent (Promega)を加え室温にて10分静置した後発光を実施例15で記載されたように測定した。

- [0230] レポーターアッセイの結果を図12に示す。アッセイは全て三連にて実施し平均値を棒グラフ表示で示し、SD値をエラーバーとして記載した。ConA刺激後8時間と10時間との比較においては10時間時点での結果がより効果の高い結果を示していたが、概ね同傾向を示していたことから、下記では10時間後の結果について詳細に記述する。宿主のF11については、LT8抗体或いはクロスリンカーの存在下、非存在下に関わらずほぼ一定の活性値を示した。これに対しポジティブコントロールクローンであるCD8-KIRfull形質導入CD8キメラクローンKIR#24の活性についてはLT8存在下では活性の減弱化が観察され、本活性減弱化はクロスリンカーの影響は受けないといった想定されたパターンを示した。一方、CD8-NKIRfull形質導入CD8キメラクローンは2クローンともLT8存在下では活性の減弱化が観察され、本活性減弱化はクロスリンカーの影響は受けなかった。また、減弱化の程度はポジティブコントロールであるCD-KIR transfectant #24が16.6%なのに対してCD-NKIR transfectant #16、#19はそれぞれ21.2%、30.2%であったことから、NKIR分子の細胞質内ITIMモチーフを含む配列が既知のKIR2DL3分子の細胞質内ITIMと同程度以上のITIM活性を有することが示唆された。

産業上の利用可能性

[0231] 本発明により、NK細胞に発現する新規なタンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該タンパク質の製造方法が提供された。さらに、該タンパク質に結合する、あるいはその活性を調節する化合物を同定する方法が提供された。本発明のタンパク質やDNA、または本発明のタンパク質に結合もしくはその活性を調節する化合物は、本発明のタンパク質が関連する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

請求の範囲

- [1] 下記(a)～(d)のいずれかに記載のDNA。
- (a) 配列番号:2、4、または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- (b) 配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA
- (c) 配列番号:2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質であって、配列番号:2、4または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA
- (d) 配列番号:1、3、または5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNA
- [2] 配列番号:2、4、または6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の断片をコードするDNA。
- [3] 請求項1または2に記載のDNAによりコードされるタンパク質。
- [4] 請求項1または2に記載のDNAを含むベクター。
- [5] 請求項1もしくは2に記載のDNA、または請求項4に記載のベクターを保持する宿主細胞。
- [6] 請求項5に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項3に記載のタンパク質の製造方法。
- [7] 請求項3に記載のタンパク質に結合する抗体。
- [8] 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質に対するリガンドの同定方法。
- (a) 請求項3に記載のタンパク質または請求項3に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程
- (b) 候補化合物が請求項3に記載のタンパク質または請求項3に記載のタンパク質を発現している細胞に結合するか否かを検出する工程
- [9] 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質に対するアゴニ

ストの同定方法。

(a) 請求項3に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程

(b) 候補化合物が請求項3に記載のタンパク質の活性化の指標となるシグナルを発生させるか否かを検出する工程

- [10] 以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項3に記載のタンパク質に対するアンタゴニストの同定方法。

(a) 請求項3に記載のタンパク質を発現している細胞と候補化合物を接触させる工程

(b) 候補化合物の非存在下で検出した場合と比較して、請求項3に記載のタンパク質の活性化の指標となるシグナルが減少するか否かを検出する工程

- [11] 請求項8に記載の方法によって同定され得る、請求項3に記載のタンパク質に対するリガンド。

- [12] 請求項9に記載の方法により同定され得る、請求項3に記載のタンパク質に対するアゴニスト。

- [13] 請求項10に記載の方法により同定され得る、請求項3に記載のタンパク質に対するアンタゴニスト。

- [14] 以下の(a)または(b)を少なくとも1つ含む、請求項8から10のいずれかに記載の方法に用いるためのキット。

(a) 請求項3に記載のタンパク質

(b) 請求項5に記載の宿主細胞

- [15] 請求項3に記載のタンパク質に対するアゴニストを有効成分として含有する、免疫抑制剤。

- [16] 請求項3に記載のタンパク質に対するアゴニストを有効成分として含有する、アレルギー性疾患または自己免疫疾患治療剤。

- [17] 請求項3に記載のタンパク質に対するアンタゴニストを有効成分として含有する、免疫増強剤。

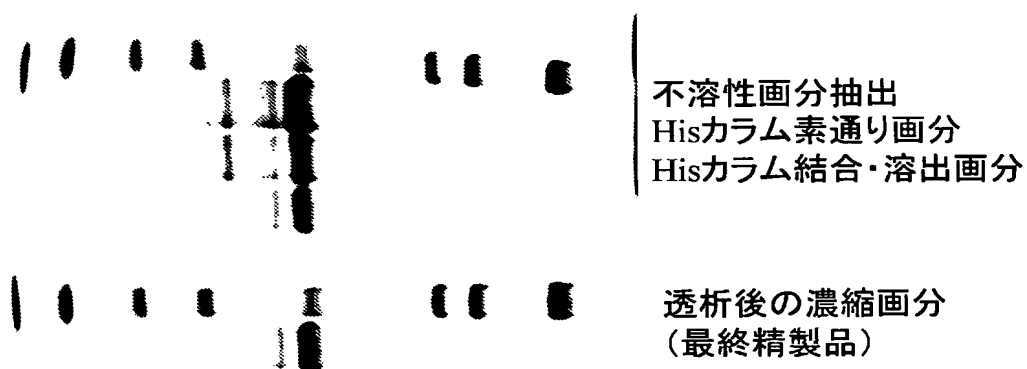
- [18] 請求項3に記載のタンパク質に対するアンタゴニストを有効成分として含有する、抗腫瘍または抗ウイルス剤。

- [19] 請求項1または2に記載のDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオ

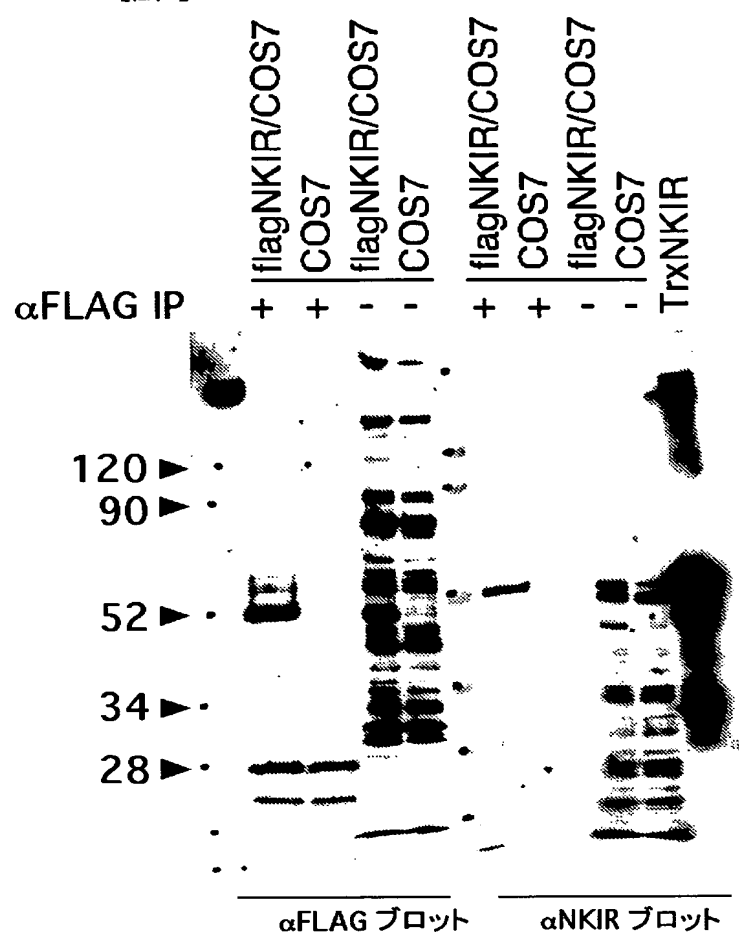
チドの鎖長を有するDNA。

- [20] 請求項19に記載のDNA、または請求項7に記載の抗体を含む、請求項3に記載のタンパク質をコードする遺伝子の発現の異常または活性の異常に関連した疾患の検査薬。

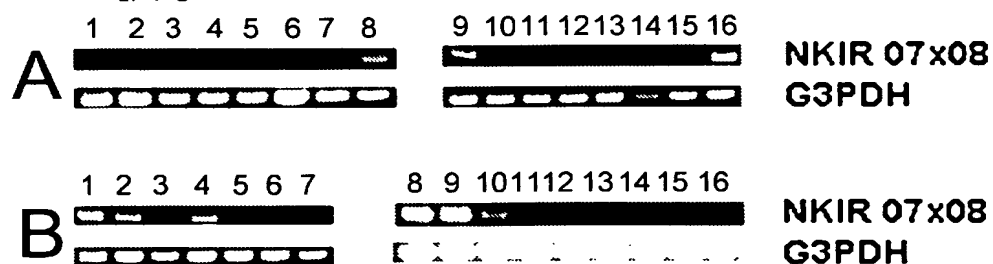
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

113.0kDa

92.0kDa

52.9kDa

35.4kDa



20 10
NK-92 細胞溶解液(μ g) コントロール

[図5]

抗NKIR一次抗体無

120

細胞数

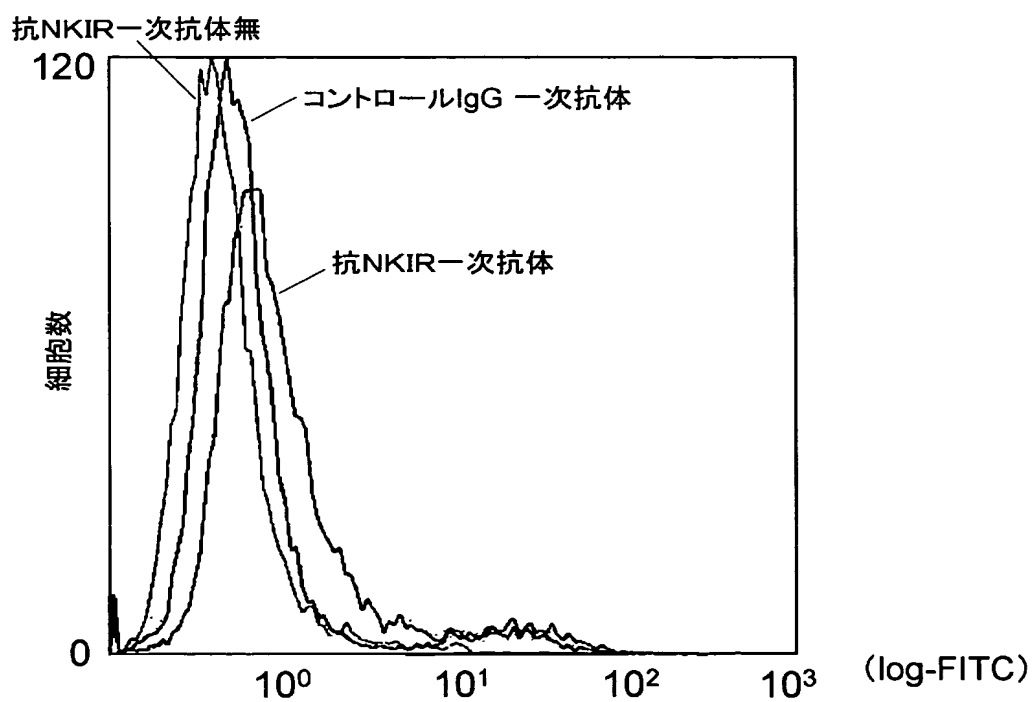
コントロールIgG 一次抗体

抗NKIR一次抗体

0

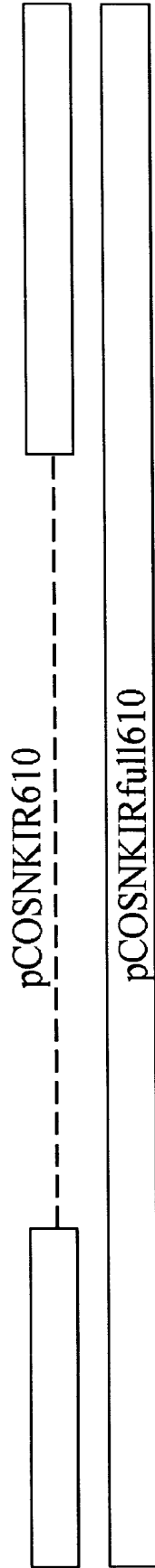
 10^0 10^1 10^2 10^3

(log-FITC)

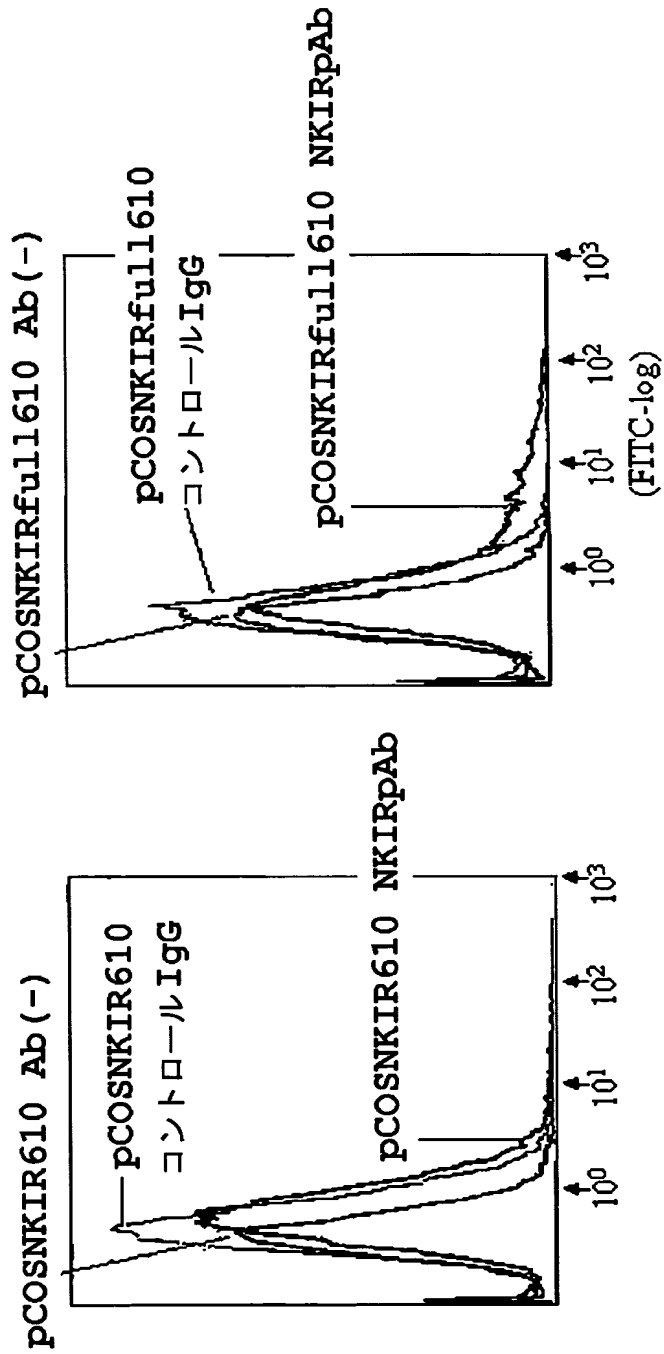


[図6]

ATGTTGCCATCTTAGGGCCCAATGCTGCTCTGGACGGCTGTGCTCTTTGTTCCCTGTGTGGGAAA
M L P S L G P M L L W T A V L L F V P C V G K



ベクター-骨格: pCOS1



[図7]

Score = 263 (92.6 bits), Expect = 1.9e-28, Sum P(3) = 1.9e-28
Identities = 62/369 (50%), Positives = 78/369 (63%), Frame = -3

Query: 197 APVSRPVLTLHHGPADPAVGDMVQLLCEAQRGSPPILYSFYLDEKIVGNHSAPCGGTTSL 256

APVS PVLTL H + AVGD V+ LCEA +GS PI YSFY++ +I+G AP G SL

Sbjct: 891239 APVSHPVLTQLQHEATNLAVGDKVEFLCEAHQGSPLIFYSFYINGEILGKPLAPSGRAASL
891060

Query: 257 LFPVKSEQDAGNYSCEAENSVSRRSEPKKLSLKGSQVL--FTPA 299

L VK+E NYSCEA+N++SRE SE KK L G + +TP

Sbjct: 891059 LASVKAENWSTKNYSCEAKNNISREISELKKFFPLVGMFCIIISYTPV 980924

細胞外候補領域

N 番目の
エクソン

Score = 82 (28.9 bits), Expect = 1.9e-28, Sum P(3) = 1.9e-28
Identities = 18/75 (72%), Positives = 20/75 (80%), Frame = -2

Query: 300 SNWLVWLPASLLGLMVIAAALLVY 324

SN L WLPASLLG MVIAA +L+Y

Sbjct: 890637 SNMLPIWLPASLLGGMVIAAAVVLMY 890563

Transmembrane領域

N+1 番目のエクソン

[8]

```
mNKIR -----
hNKIR MLPSLVPCVGKTVWLYLQAWPNPVFEGDALTLRCQGWKNTPLSQVKFYRDKGKFLHFSKEN

mNKIR -----MLL-WMVPLLCDs-MVEAQELFPNPELTFETNSETMD-
hNKIR QTLsmGAATVQSRGQYSCSGQVMYIPQTFTQTSETAMVQVQELFPPPPVLSAIPSPPEPREG
      *::      :: ***** * * : ..... :
      * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..:

mNKIR --VILKCTIKVDPKNTLQLFYTFYKDNHVIQDRSPH-SVFSAAKEENSGLYQCMVDTE
hNKIR SLVTLRCQTKLHPLRSALRLLFSFHKDGHDTLQDRGPHPELCIPGAKEGDSGLYWCEVAPE
      * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..:

mNKIR DGLIQKKSGYLDIQFWTPVSHPVLTQLQHEATNLAVGDKVEFLCEAHQGSLLPFIYFSFYING
hNKIR GGQVQKQSPQLEVRVQAPVSRPVLTLHHGPADPAVGDMVQLLCEAQRGSPPILYSFYLDE
      . * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..:

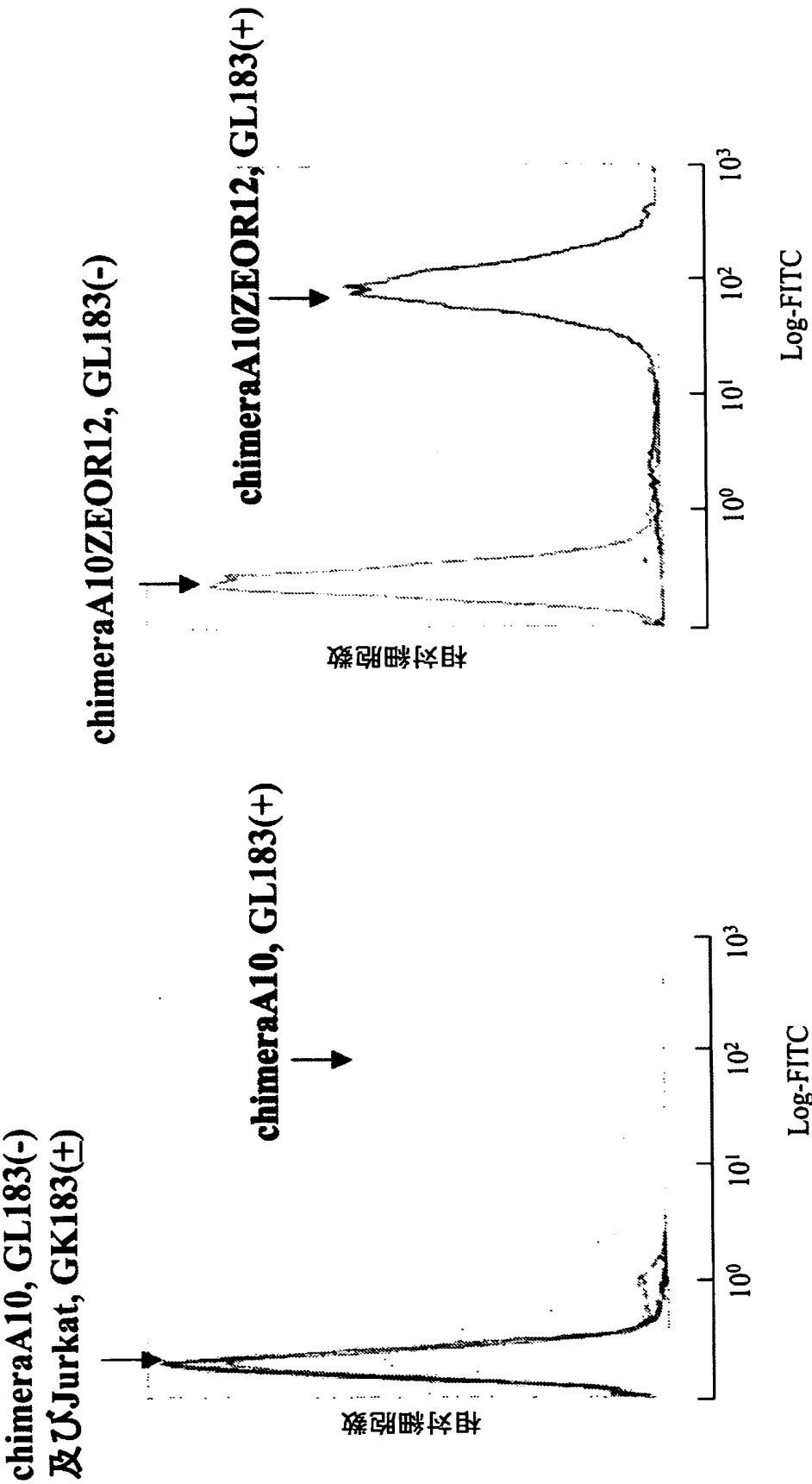
mNKIR EILGKPLAPSGRAASLLASVKAEWSTKNYSCEAKNNISREISELKKFPLVVSGTAWIKS-
hNKIR KIVGNHSAPCGGTTSLFLPVKSEQDAGNYSCEAENSVSRRSEPKKLSLKGSQLFTPAS
      : * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..:

mNKIR NMLTIWLPASLLGGMVIAAVVLMYFFKPKKHARLEMP TLKEPDS ---FLYVSDNRRYK
hNKIR NWLVPWL PASLLGLMVIAAALLVYVRSWRKAGPLPSQIPPTAPGGEQCPLYANVHHQKGK
      * * . ***** * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..: * * * * * ..:

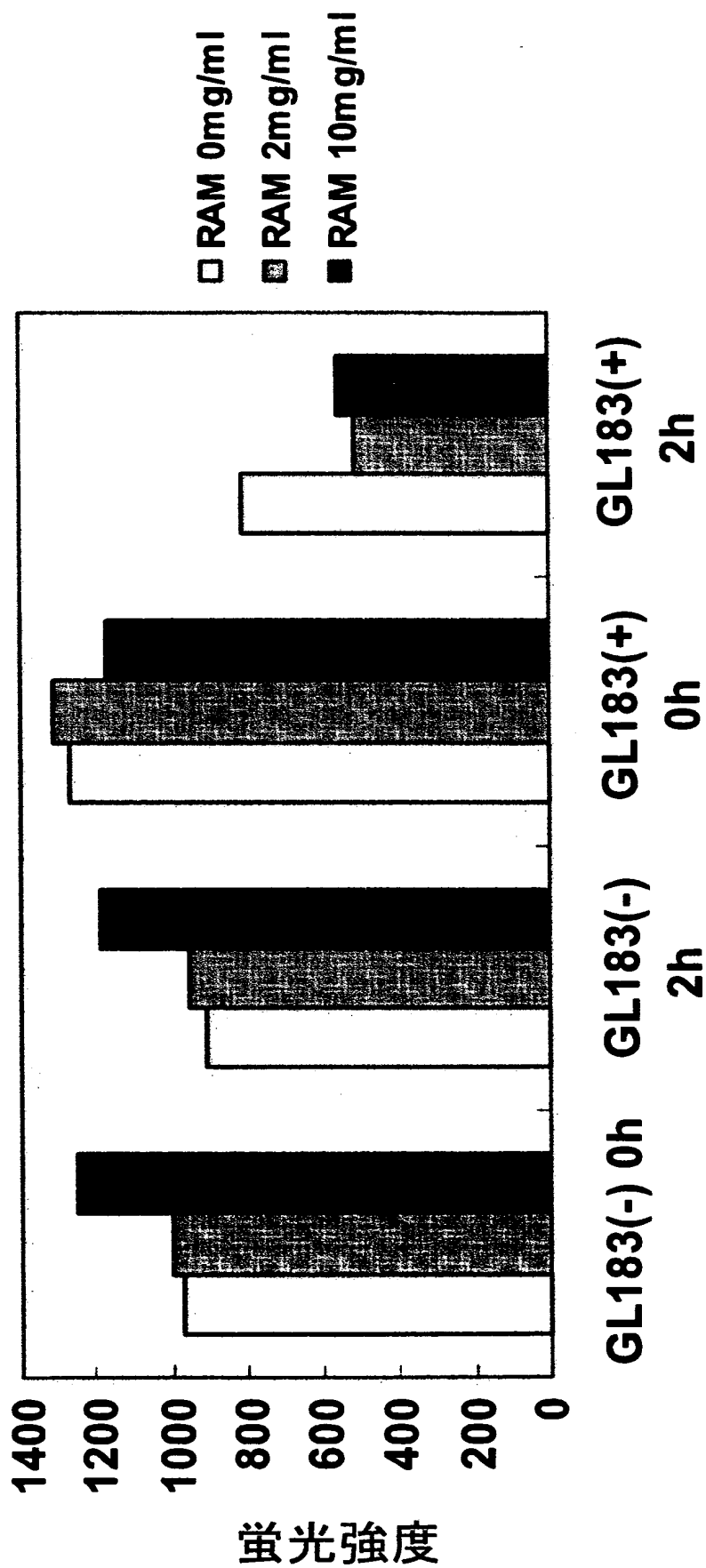
mNKIR -----
hNKIR DEGVVYSVVHRTSKRSEARSAEFTVGRKDSII CAEVRCLQPSEVSSTEVMNRSRTLQEP

mNKIR -----
hNKIR LSDCEEVLC
```

[図9]

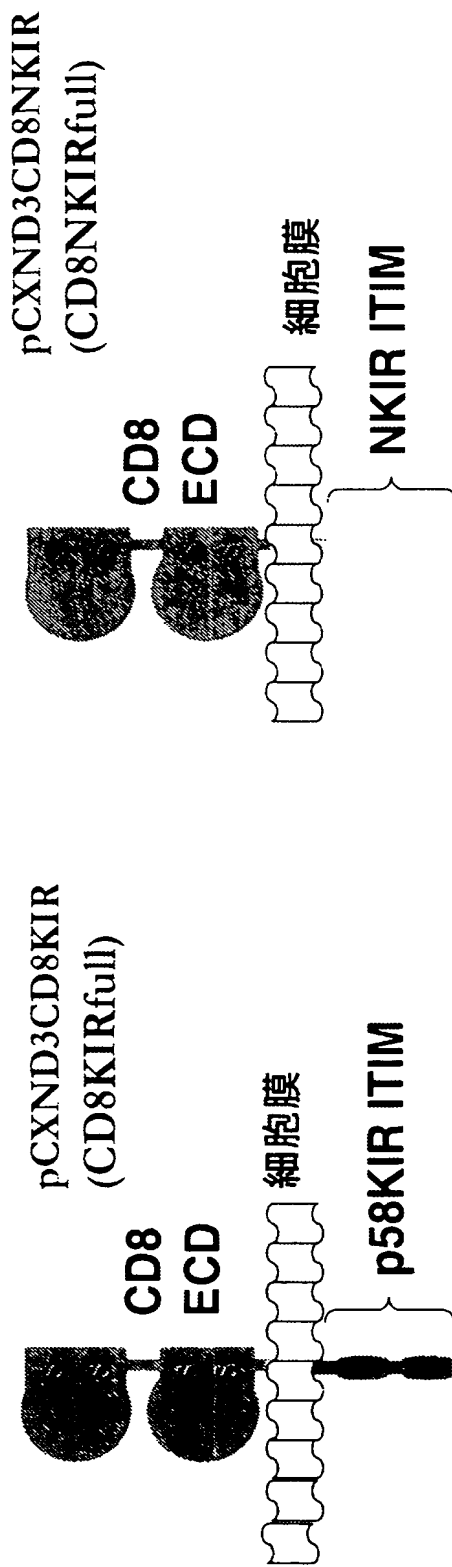


[図10]

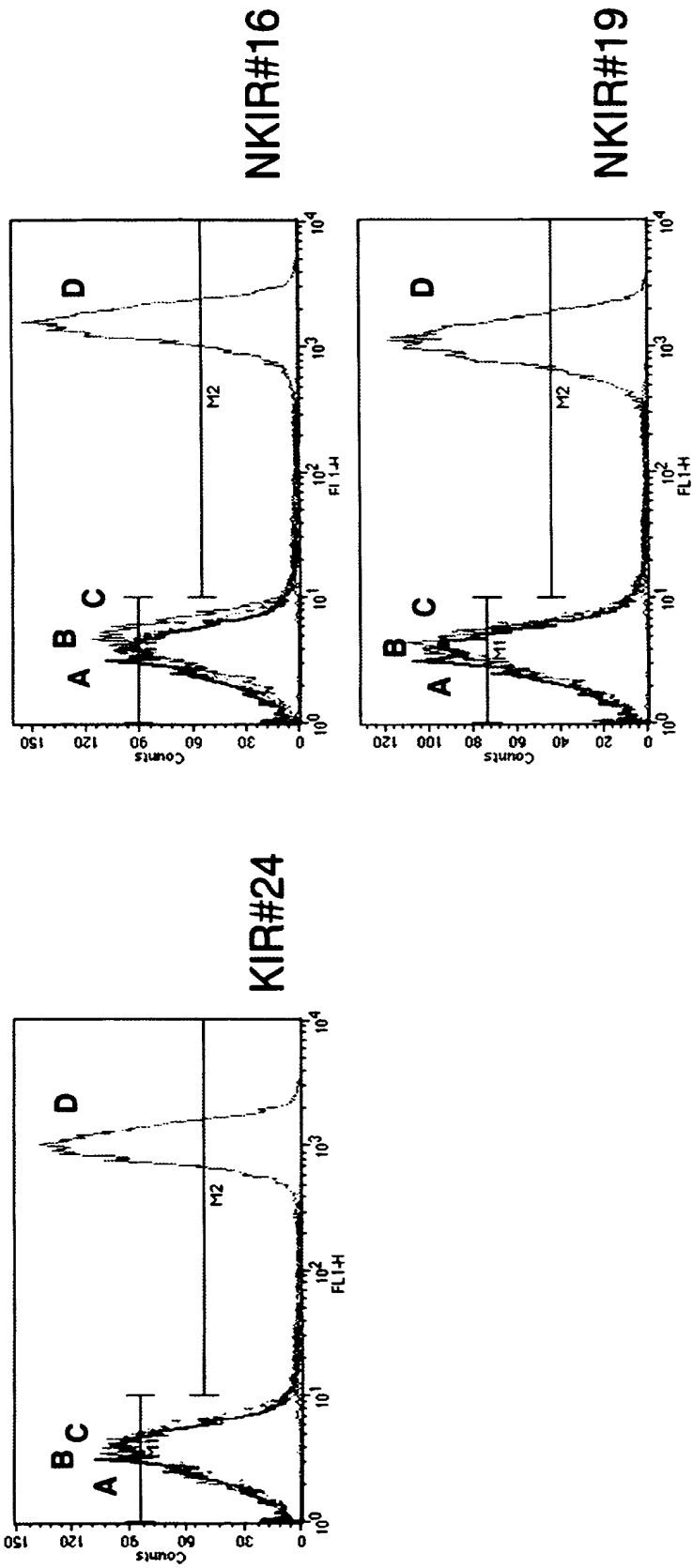


一次抗体の存在または非存在及び二次抗体反応時間

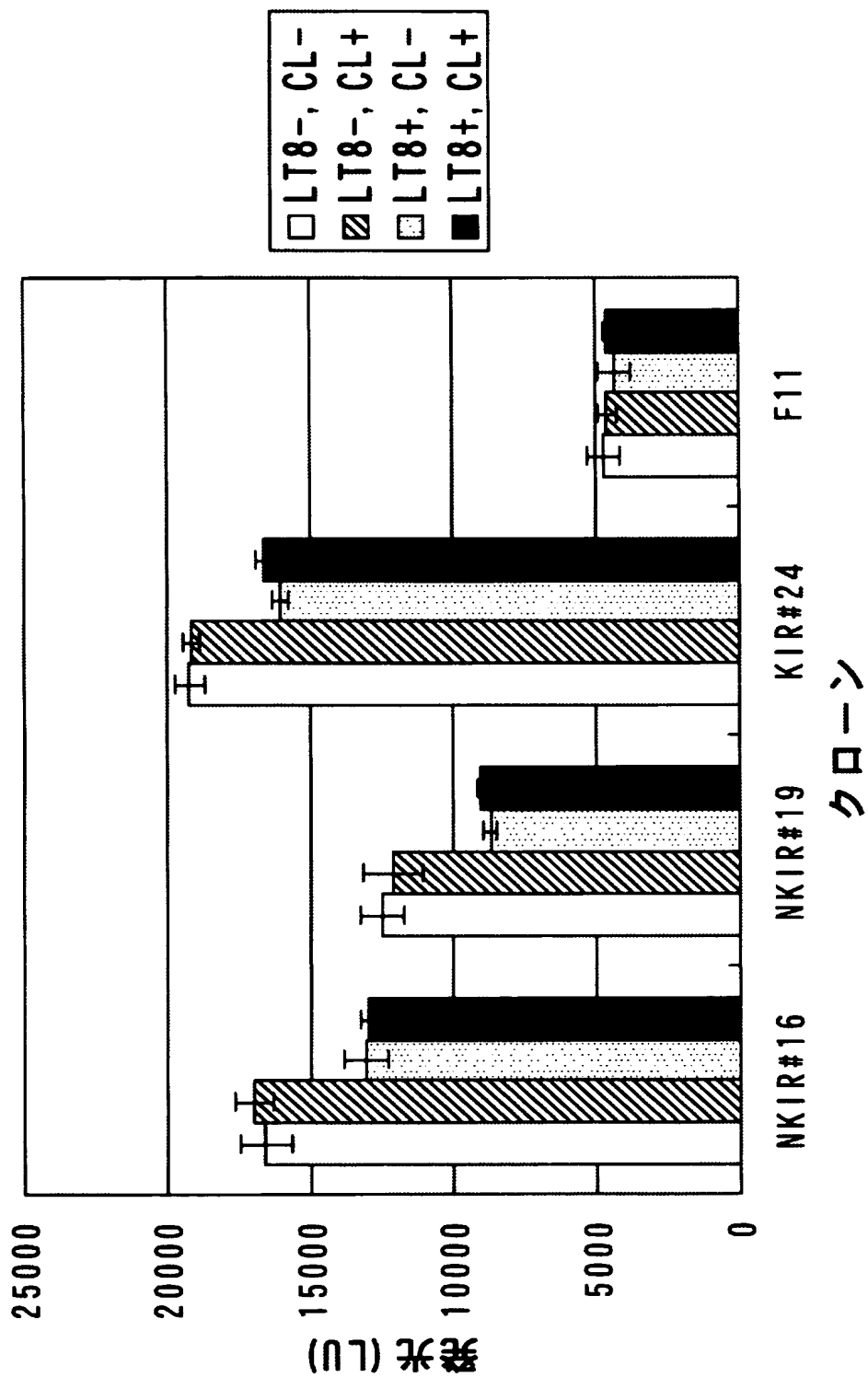
[図11-1]



[図11-2]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, A61K45/00, A61P1/16, A61P11/06, A61P31/12, A61P31/14, A61P35/00, A61P37/04, A61P37/06, A61P37/08, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, A61K45/00, C07K14/705, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1201681 A (Millennium Pharmaceuticals, Inc.), 02 May, 2002 (02.05.02), Full text; Seq. ID. Nos. 6, 34 & US 2003175890 A	1-10, 14, 19, 20
P, X	WO 03/89624 A (UAB RESEARCH FOUNDATION), 30 October, 2003 (30.10.03), Full text; Seq. ID. Nos. 27, 28 (Family: none)	1-7, 19, 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 October, 2004 (15.10.04)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014207

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl⁷ C21P21/02, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

the meaning within Patent Corporation Treaty Article 5.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

is a technical relationship between the inventions of the parts relating to a protein as set forth in claim 1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or 4 and the inventions of the parts relating to the protein as set forth in claim 1 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6, among the inventions as set forth in claims 1 to 20, involving one or more of the same or corresponding special technical features. Thus, these groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the present international application does not comply with the requirement of unity of invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014207

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014207

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 11-13, 15-18
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Concerning the ligand, the agonist and the antagonist according to claims 11 to 13 and 15 to 18, it is impossible to find anything that is supported by the description in the meaning within Patent Cooperation Treaty Article 6 and disclosed in the description in (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

A protein as set forth in claim 1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or 4 and the protein as set forth in claim 1 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:6 have no novel chemical structure in common but are common to each other exclusively in being an NK cell receptor protein. However, NK cell receptor proteins had been publicly known before the priority date of the present case as reported in No.2003-527105 Published Japanese translation of PCT international publication. Thus, being an NK cell receptor protein cannot be considered as a special technical matter as defined in Patent Cooperation Treaty Rule 13.3.

Therefore, it does not appear that there (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C12N 15/09 A61K 45/00 A61P 1/16 A61P 11/06 A61P 31/12 A61P 31/14 A61P 35/00 A61P 37/04 A61P 37/06 A61P 37/08 C07K 14/705 C07K 16/28 C12N 1/15 C12N 1/19 C12N 1/21 C12N 5/00 C12P 21/02 C12Q 1/02 G01N 33/15 G01N 33/50

3, 4, 5, 6, 8

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C12N 15/09 A61K 45/00 C07K 14/705 C07K 16/28 C12N 1/15 C12N 1/19 C12N 1/21 C12N 5/00 C12P 21/02 C12Q 1/02 G01N 33/15 G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/BIOTECHABS/WPIDS (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 1201681 A (Millennium Pharmaceuticals, Inc.) 2002.05.02, 文献全体、Seq. ID. No6, 34 & US 2003175890 A	1-10, 14, 19, 20
PX	WO 03/89624 A (UAB RESEARCH FOUNDATION) 2003.10.30, 文献全体、Seq. ID. No27, 28 (ファミリーなし)	1-7, 19, 20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.10.2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4B

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、
以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 11-13, 15-18 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲11-13, 15-18のリガンド、アゴニスト、アンタゴニストについて、特許協力条約第6条の意味において明細書に裏付けられ、また、特許協力条約第5条の意味において明細書に開示されているものは何ら見いだせない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1に記載の配列番号: 2、4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と、請求の範囲1に記載の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、互いに共通の新規な化学構造を有するものではなく、ただ、NK細胞の受容体タンパク質である点で共通するものであるが、NK細胞の受容体タンパク質なるものは、特表2003-527105号公報に記載されていて本願優先日前に公知であるから、NK細胞の受容体タンパク質である点が、特許協力条約に基づく規則13.3に規定する特別な技術的事項であるとはいえない。

したがって、請求の範囲1-20に記載される発明のうち、請求の範囲1に記載の配列番号: 2、4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に関連する部分の発明と、請求の範囲1に記載の配列番号6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に関連する部分の発明の間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係があるとはいえず、両者が単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえない。

したがって、この国際出願は、発明の単一性の要件を満たしていない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ ~~BLACK BORDERS~~

☐ ~~IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES~~

☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~

☐ ~~BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING~~

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.